

# Expression mesenchymaler Stammzell-Marker auf Sarkomen

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard Karls Universität  
zu Tübingen

vorgelegt von

Simone Anita Rieger

aus

Esslingen am Neckar

|                      |                                   |
|----------------------|-----------------------------------|
| Dekan:               | Prof. Dr. med. Ingo B. Autenrieth |
| 1. Berichterstatter: | Prof. Dr. med. Hans-Georg Kopp    |
| 2. Berichterstatter: | Prof. Dr. med. univ. Bence Sipos  |
| Tag der Disputation  | 18. Juli 2016                     |



# Inhaltsverzeichnis

## Abkürzungsverzeichnis

|          |   |          |
|----------|---|----------|
| <b>1</b> | <b>Einleitung.....</b>                                | <b>1</b> |
| 1.1      | Weichteilsarkome .....                                | 1        |
| 1.2      | Klassifikation der Weichteilsarkome.....              | 2        |
| 1.3      | Mesenchymale Herkunft der Weichteilsarkome .....      | 2        |
| 1.4      | Mesenchymale Marker auf Weichteilsarkomen.....        | 3        |
| 1.5      | Fragestellung.....                                    | 3        |
| <b>2</b> | <b>Material und Methoden.....</b>                     | <b>5</b> |
| 2.1      | Material der IHC und der Durchflusszytometrie .....   | 5        |
| 2.1.1    | Multi tissue.....                                     | 5        |
| 2.1.2    | Mesenchymale Stammzellen und Vorhautfibroblasten..... | 5        |
| 2.1.3    | Charakteristik des primären Sarkomgewebes .....       | 5        |
| 2.1.4    | Primäre und sekundäre Antikörper .....                | 7        |
| 2.1.5    | Primärantikörper .....                                | 7        |
| 2.1.6    | Sekundärantikörper .....                              | 9        |
| 2.1.7    | Chemikalien, Reagenzien.....                          | 9        |
| 2.1.8    | Lösungen und Medien .....                             | 10       |
| 2.1.9    | Apparate, Geräte und Software .....                   | 11       |
| 2.1.10   | Bedarfsartikel.....                                   | 12       |
| 2.1.11   | Material aus der Pathologie .....                     | 12       |
| 2.2      | Methoden der IHC .....                                | 13       |
| 2.2.1    | Lagerung des primären Gewebes .....                   | 13       |
| 2.2.2    | Herstellung der Kryoschnitte.....                     | 13       |
| 2.2.3    | Immunhistochemisches Färbeprotokoll .....             | 14       |
| 2.2.4    | Hämatoxylin- und Eosin-Färbungen .....                | 14       |

|          |  |           |
|----------|--|-----------|
| 2.2.5    | Überprüfung der Zellmorphologie und Spezifität der IHC-Färbung         | 15        |
| 2.2.6    | Bewertung der IHC .....  | 15        |
| 2.2.7    | Fotografische Dokumentation der IHC .....                              | 15        |
| 2.2.8    | Kontrolle der Datenerhebung der IHC-Färbung.....                       | 15        |
| 2.3      | Methoden der Durchflusszytometrie.....                                 | 16        |
| 2.3.1    | Zellkulturarbeiten .....   | 16        |
| 2.3.2    | Aufbereitung von primären Sarkomgewebe .....                           | 16        |
| 2.3.3    | Aufbereitung der mesenchymalen Stammzellen .....                       | 16        |
| 2.3.4    | Auftauen von Sarkomzellen und MSC.....                                 | 16        |
| 2.3.5    | Zellkultivierung der Sarkomzellen.....                                 | 17        |
| 2.3.6    | Durchflusszytometrie .....   | 17        |
| 2.4      | Auswahlkriterien der weiteren Validierung .....                        | 18        |
| <b>3</b> | <b>Ergebnisse.....</b>   | <b>19</b> |
| 3.1      | Erläuterung der Abkürzungen, Interpretationskriterien und Tabellen.... | 19        |
| 3.1.1    | Abkürzungen der Sarkomtypen .....                                      | 19        |
| 3.1.2    | Erläuterung zum Multi tissue und Normalgewebe .....                    | 19        |
| 3.1.3    | IHC-Färbung, Abkürzungen, Interpretationskriterien und Tabellen        | 19        |
| 3.1.4    | Aussagekraft der Kontrollen und Bewertungen .....                      | 20        |
| 3.2      | Vorstellung der Antikörper.....  | 20        |
| 3.2.1    | Übersicht der Antikörper .....   | 20        |
| 3.2.2    | Auswahlkriterien der angewandten Antikörper .....                      | 22        |
| 3.3      | Aufbau der Ergebnisdarstellung der ausgewählten Antikörper .....       | 23        |
| 3.3.1    | Aufbau der IHC-Ergebnisdarstellung .....                               | 23        |
| 3.3.2    | Erläuterung der FACS-Analyse .....                                     | 23        |
| 3.3.3    | Fotos der Hämatoxylin-Eosin-Färbung des Multi tissue .....             | 25        |
| 3.3.4    | Übersicht der ausgewählten Antikörper.....                             | 26        |

|          |   |            |
|----------|---|------------|
| 3.3.5    | Präsentationsbeispiel der Ergebnisse .....  | 27         |
| 3.4      | Präsentation der Ergebnisse der acht Antikörper.....  | 28         |
| 3.4.1    | I. Antikörper CD271 .....   | 28         |
| 3.4.2    | II. Antikörper CD318C32.....  | 34         |
| 3.4.3    | III. Antikörper W8B2B10 .....   | 40         |
| 3.4.4    | IV. Antikörper W3C4-CD349.....  | 46         |
| 3.4.5    | V. Antikörper W7C5F8-CD109 .....  | 52         |
| 3.4.6    | VI. Antikörper W5C5 .....   | 58         |
| 3.4.7    | VII. Antikörper W3D5A9.....   | 64         |
| 3.4.8    | VIII. Antikörper 39D5-CD56 .....  | 70         |
| 3.5      | Zusammenschau der acht Antikörper in ihren Ergebnissen: Expression,<br>mögliche Relevanz und Anwendbarkeit..... | 76         |
| 3.6      | Zusammenfassende Interpretation der Ergebnisse der acht Antikörper<br>76  |            |
| <b>4</b> | <b>Diskussion .....</b>   | <b>81</b>  |
| <b>5</b> | <b>Zusammenfassung .....</b>  | <b>90</b>  |
| <b>6</b> | <b>Abbildungs- und Tabellenverzeichnis .....</b>  | <b>92</b>  |
| <b>7</b> | <b>Literaturverzeichnis.....</b>  | <b>95</b>  |
| <b>8</b> | <b>Anhang.....</b>  | <b>101</b> |
| 8.1      | Erklärung zum Eigenanteil .....   | 101        |
| 8.2      | Versicherung an Eides statt .....   | 103        |
| 8.3      | Danksagung .....  | 104        |



## Abkürzungsverzeichnis

|       |                                   |
|-------|-----------------------------------|
| %     | Prozent                           |
| X     | Vergrößerung mal                  |
| <     | kleiner als                       |
| >     | größer als                        |
| -     | von bis                           |
| Abb.  | Abbildung                         |
| AK    | Antikörper                        |
| APC   | Allophycocyanin                   |
| BDNF  | brain derived neurotrophic factor |
| BG    | Bindegewebe                       |
| BSA   | Bovines Serum Albumin             |
| CA    | Karzinom                          |
| ca.   | circa                             |
| CD    | Cluster of differentiation        |
| c-kit | Stammzell-Rezeptor                |
| CSC   | cancer stem cell                  |
| CUB1  | CUB-domain-containing protein 1   |
| DAB   | 3,3'-Diaminobenzidin              |
| DFZ   | Durchflusszytometrie              |
| DMSO  | Dimethylsulfoxid                  |

|                         |                                     |
|-------------------------|-------------------------------------|
| Dot plots               | Punktauftragung                     |
| E                       | epithelial                          |
| EtOH                    | Ethanol                             |
| EZ                      | extrazellulär                       |
| FACS                    | Fluorescence-activated cell sorting |
| FITC                    | fluorescein isothiocyanate          |
| FSC                     | forward scatter                     |
| gl. Muskulatur          | glatte Muskulatur                   |
| h                       | Human                               |
| H.E.                    | Hämatoxylin-Eosin                   |
| HRP                     | Meerrettichperoxidase               |
| IgG, IgM                | Immunglobulin G und M               |
| IHC                     | Immunhistochemie                    |
| Kap.                    | Kapillare, kleine Blutgefäße        |
| LMS                     | Leiomyosarkom/e                     |
| LS                      | Liposarkom/e                        |
| LSC                     | Leukemic stem cell                  |
| mAb                     | Monoklonale Antikörper              |
| Mammakarzinom, Mamma CA | Brustkrebs                          |
| Matrix                  | Interzellulärsubstanz               |
| min.                    | Minute                              |

|                |   |
|----------------|---|
| MSC            | Mesenchymale Stammzelle   |
| MSCA-1         | mesenchymal stromal cell antigen-1  |
| M.t.           | Multi tissue  |
| Multi tissue   | ein künstlich erstellter Schnitt aus vier Gewebearten: Haut, glatter Muskulatur, Fett u. Mamma-Karzinom |
| NB             | nicht beurteilbar   |
| NEG/neg.       | negativ   |
| NG             | Normalgewebe  |
| NK             | Natürliche Killer   |
| NK-T-Zellen    | Natürliche Killer-T-Zellen  |
| NP             | neural progenitor cell  |
| od.            | oder  |
| Originalvergr. | Originalvergrößerung  |
| PBS            | Phosphate buffered saline   |
| pH             | Säuregrad   |
| RMS            | Rhabdomyosarkom/e   |
| POS/pos.       | Positiv   |
| PS             | Penicillin/Streptomycin   |
| Sarkom         | Synovial-, Muskel- und Fettgewebe   |
| SB             | schwer zu beurteilen  |
| spez.          | spezifisch  |

|              |  |
|--------------|--|
| SP           | spezifisch                                   |
| SSC          | Side Scatter                                 |
| Syn. S.      | Synovial Sarkom/e                            |
| SUSD2        | sushi domain containing 2                    |
| Tab.         | Tabelle                                      |
| TNAP         | Tumor necrosis factor, alpha-induced protein |
| Tü           | Tübingen, Onkologie                          |
| TNF          | Tumornekrosefaktor                           |
| u.           | und  |
| UKT          | Universitätsklinikum Tübingen                |
| unspez., USP | unspezifisch                                 |
| WTS          | Weichteilsarkom/e                            |
| vs.          | versus                                       |
| z.B.         | zum Beispiel                                 |
| ZK           | Zellkern                                     |
| ZP           | Zytoplasma                                   |
| zw.          | Zwischen                                     |



# 1 Einleitung

Die wissenschaftliche Aufarbeitung der Literatur und Erstellung der Arbeitshypothese, sowie die praktisch angewandten Verfahren erfolgten gemeinschaftlich in der Arbeitsgruppe Kopp und Wirths. Die Daten zur FACS-Analyse wurden in genannter Kooperation erhoben. Diese Teile der vorliegenden Dissertation wurden im Dezember 2012 in der Publikation „Shared Cell Surface Marker Expression in Mesenchymal Stem Cells and Adult Sarcomas“ veröffentlicht im Journal Stem Cells Translational Medicine (1). Die Immunhistochemie-Färbungen (IHCs) an den Weichteilsarkomen (WTS) und die Erstellung der Bewertungskriterien für die IHCs wurden von der Autorin durchgeführt, ebenso die primäre Erhebung der Daten.

## 1.1 Weichteilsarkome

Fortgeschrittene adulte Weichteilsarkome sind seltene Tumore mit schlechter Prognose und eingeschränkter systematischer Behandlungsmöglichkeit. Weichteilsarkome umfassen verschiedene histologische Untergruppen, die ein Spektrum an biologischen und prognostisch unterschiedlichen Erkrankungen widerspiegeln. Patienten mit WTS sind typischerweise im jungen Alter und zeigen eine gute Verfassung, welche nicht notwendigerweise mit Tumorbeschwerden einhergeht, sprechen aber nicht gut auf systematische Behandlungen an und haben daher eine schlechte Prognose, so dass jeder zweite Patient letztendlich an der Erkrankung verstirbt (2). Allerdings, trotz der Seltenheit von Weichteiltumoren, rangieren sie unter den fünf häufigsten Todesursachen unter Jugendlichen und jungen Erwachsenen in den USA (3).

## **1.2 Klassifikation der Weichteilsarkome**

Die histopathologische Klassifikation von WTS basiert auf der morphologischen Ähnlichkeit des Tumors korrespondierend zum Normalgewebe. In anderen Worten, die morphologische Diagnose ergibt sich aus der bösartigen Zellveränderung (4). Immunhistochemie ermöglicht es, WTS in Untergruppen zu unterteilen, basierend auf den verbleibenden differenzierten Strukturen, und von den nicht mehr spezifizierten, undifferenzierten pleomorphen WTS zu unterscheiden, zuvor als malignes fibröses Histiocytom (4-6) bekannt.

Erfolg bei der Behandlung von seltenen WTS Untertypen wie GIST (Gastrointestinale Stromatumoren) und DFSP (Dermatofibrosarcoma Protuberans) zeigten, dass ein besseres Verständnis der molekularen Mechanismen der WTS-Biologie helfen könnte, therapeutische Ziele und die Prognose von WTS Patienten zu verbessern (7, 8).

Dennoch gehört die absolute Mehrheit von adulten WTS zu einer Gruppe von Sarkomen mit komplexen Karyotypen ohne konstant identifizierte molekulare Veränderungen, wie das pleomorphe Sarkom, LMS, pleomorphe LS und RMS, Angiosarkom, Osteosarkom, Myxofibrosarkom und myofibroblastisches Sarkom (9).

## **1.3 Mesenchymale Herkunft der Weichteilsarkome**

Die mesenchymale Herkunft von WTS erscheint eindeutig, da die Tumore oftmals adipöse, glatt oder gestreift muskuläre oder knorpel-ähnliche Differenzierungen aufweisen. Analog zu hämatopoetischen Stammzellen als Ursprung der Malignität bei Leukämie (Leukämie Stammzellen, LSC) (10) und epithelialen Stammzellen in Karzinomen (Karzinomstammzellen, CSC) (11-13), wird die Hypothese aufgestellt, dass mesenchymale Stammzellen die Ursprungszellen für Sarkome sind (14-19).

Daher könnten Sarkomstammzellen die Entwicklung des entsprechenden Normalgewebes rekapitulieren (20) und eine immunphänotypische Ähnlichkeit mit MSCs aufweisen.

Es wurde ein neuartiges Panel von humanen, in Mäusen generierten, Antikörpern entwickelt, die nicht nur geeignet für die phänotypische Charakterisierung kultivierter MSCs sind, sondern auch für die Isolation von MSCs aus Knochenmark und bzw. oder Plazenta (21).

#### **1.4 Mesenchymale Marker auf Weichteilsarkomen**

Bei Leukämien, die ebenfalls zu den seltenen Erkrankungen gehören, kann mit Hilfe der Immunphänotypisierung eine klinische Einschätzung und eine Vorhersage des Therapieansprechens getroffen werden (22). In der Arbeitsgruppe der Autorin wurde durch die Anwendung eines neuen MSC Marker Panels, das von der AG Bühring zur Isolierung von MSC produziert und freundlicherweise zur Anwendung an Sarkomen zur Verfügung gestellt wurde, ein Expressionsprofil von Sarkomen etabliert, einschließlich ausgewählter Marker von hämatopoetischen und epithelialen Vorläuferzellen wie CD34, CD117 und CD133. Dafür wurden sowohl Zelllinien als auch primäre Tumorproben bezüglich der häufigsten histologischen Merkmale mit der Durchflusszytometrie analysiert. Beide Zelltypen zeigten häufig Expressionsmuster von mesenchymalen, aber nicht von hämatopoetischen oder epithelialen Vorläuferzell-Markern. Bei der Untersuchung von Vorhautfibroblasten oder embryonalen Gewebe konnte eine weitere, mit MSCs übereinstimmende Markergruppe entdeckt werden, was einen Zusammenhang zwischen Fibroblasten, MSCs und Weichteilsarkomen erkennen lässt.

#### **1.5 Fragestellung**

In der Arbeitsgruppe Kopp und Wirths wurde die oben beschriebene Arbeitshypothese gemeinsam erstellt und eine Gruppe von MSC-Markern mit Durchflusszytometrie etabliert, die dem Expressionsprofil in Sarkomzelllinien und primären Tumorproben entsprechen. Zusätzlich wurden Fibroblasten verschiedenen Ursprungs untersucht. Das Ergebnis zeigte eine beträchtliche Anzahl an MSC-Markern auf Sarkomzellen.

Das Expressionsprofil beinhaltete gleichmäßig exprimierte Marker, sowie MSC-Marker, welche nur in Subpopulationen der Sarkomzellen vorkommen.

Ziel der Arbeit ist es, diese Marker auf primärem Tumormaterial immunhistochemisch zu färben und die Sarkome nach Art und Intensität der angefärbten Struktur, die prozentual angefärbte Tumorfläche und die Verteilung der angefärbten Tumorareale zu charakterisieren.

## **2 Material und Methoden**

### **2.1 Material der IHC und der Durchflusszytometrie**

Alle verwendeten und aufgeführten Gewebe und Zellen stammen von Patienten der Universitätsklinik Tübingen und dürfen aufgrund deren Einverständniserklärung für Forschungszwecke verwendet werden.

Alle Gewebestücke wurden bei -80°C gelagert und anschließend zu histologischen Kryoschnitten bzw. für die Durchflusszytometrie aufgearbeitet.

#### **2.1.1 Multi tissue**

Als Kontrollgewebe diente ein Multi tissue-Block bestehend aus folgenden Gewebestücken: Haut, glatter Muskulatur des Darms, Mamma-Karzinom und Fett.

#### **2.1.2 Mesenchymale Stammzellen und Vorhautfibroblasten**

Die hier verwendeten mesenchymalen Stammzellen und Vorhautfibroblasten stammen von gesunden Knochenmarkspendern und wurden von der Arbeitsgruppe kultiviert.

#### **2.1.3 Charakteristik des primären Sarkomgewebes**

Die primären Sarkomgewebe sind in der folgenden Tabelle 1 aufgeführt. Davon immunhistochemisch gefärbt wurden: vier Leiomyosarkome, fünf Rhabdomyosarkome, fünf Liposarkome. Das Resultat des einzelnen Myxofibrosarkom wird wegen zu geringer Aussagekraft später nicht mit aufgeführt.

Tabelle 1 Charakteristik der Patienten für IHC und Durchflusszytometrie

| Patienten Nummer | Geschlecht | Alter | Diagnose                        | Histopathologie Grading (G) |
|------------------|------------|-------|---------------------------------|-----------------------------|
| 1                | M          | 56    | Leiomyosarkom                   | G2                          |
| 2                | F          | 76    | Leiomyosarkom                   | G3                          |
| 3                | F          | 68    | Leiomyosarkom                   | G3                          |
| 4                | F          | 48    | Metastase vom Leiomyosarkom     | G2                          |
| 5                | F          | 79    | Myxofibrosarkom                 | G2                          |
| 6                | F          | 25    | Rhabdomyosarkom                 | G3                          |
| 7                | F          | 4     | Rhabdomyosarkom                 | G3                          |
| 8                | M          | 2     | Rhabdomyosarkom                 | G3                          |
| 9                | F          | 4     | Rhabdomyosarkom                 | G3                          |
| 10               | F          | 4     | Rhabdomyosarkom                 | G3                          |
| 11               | F          | 26    | pleomorphes Liposarkom          | G3                          |
| 12               | M          | 81    | Liposarkom                      | G1                          |
| 13               | F          | 56    | Liposarkom                      | G2                          |
| 14               | F          | 26    | Liposarkom                      | G3                          |
| 15               | F          | 68    | Liposarkom                      | G1                          |
| 16               | F          | 25    | Spindelzelliges Rhabdomyosarkom | G3                          |
| 17               | M          | 32    | Alveoläres Rhabdomyosarkom      | G3                          |
| 18               | F          | 51    | Liposarkom                      | G1                          |

|    |   |    |                 |    |
|----|---|----|-----------------|----|
| 19 | M | 75 | Leiomyosarkom   | G3 |
| 20 | F | 76 | Leiomyosarkom   | G3 |
| 21 | M | 58 | Leiomyosarkom   | G2 |
| 22 | M | 81 | Myxofibrosarkom | G3 |

#### 2.1.4 Primäre und sekundäre Antikörper

Der primäre Antikörper mit seiner charakteristischen Struktur bindet an das Zielantigen des zu untersuchenden Gewebes an. Der sekundäre Antikörper ist gegen das Tier gerichtet, in dem der Primärantikörper produziert wurde. Der Sekundärantikörper wiederum ist HRP konjugiert, wodurch die Bindung über ein Substrat sichtbar gemacht werden kann. Somit kann eine Aussage über die Bindung des primären Antikörpers am Gewebe getroffen werden.

#### 2.1.5 Primärantikörper

**Tabelle 2 Übersicht der monoklonalen Antikörper für IHC und Durchflusszytometrie**

| <b>mAb Klone</b> | <b>Antigen</b> | <b>Isotyp</b> | <b>Hersteller, Referenz</b> |
|------------------|----------------|---------------|-----------------------------|
| CUB1             | CD318          | IgG2a         | Biolegend                   |
| ME20.4-1.H4      | CD271-APC      | IgG1          | Miltenyi                    |
| A3C6             | CD117          | IgG1          | Biolegend                   |
| W8B2             | TNAP, MSCA-1   | IgG1          | Publikationen (25, 34)      |
| 97C5             | CD10           | IgG1          | Publikation (39)            |
| 28D4             | CD140b         | IgG2b         | Publikation (21)            |
| W3C4             | CD349          | IgM           | Publikation (40)            |
| 104D2D1          | CD117          | IgG1          | Publikation (39)            |

|          |         |       |                       |
|----------|---------|-------|-----------------------|
| W7C5F8   | CD109   | IgG1  | Publikation (41)      |
| 1G2C2    | CD105   | IgG3  | Publikation (25)      |
| 24D2     | CD340   | IgG1  | Publikation (21)      |
| 67D2     | CD164   | IgG1  | Publikationen (42,43) |
| SE12C3   | CD172a  | IgG1  | Publikation (44)      |
| W6B3C1   | CD133   | IgG1  | Publikation (25)      |
| CH3A4A7  | CD344   | IgG1  | Publikation (38)      |
| 67A4     | CD324   | IgG1  | Publikation (45)      |
| 9C4      | CD326   | IgG2b | Publikation (45)      |
| 39D5     | CD56    | IgG1  | Publikation (46)      |
| 43A1     | CD34    | IgG3  | Publikation (47)      |
| 57D2     | NPC     | IgG1  | Publikation (24)      |
| W5C5     | SUSD2   | IgG1  | Publikation (21)      |
| W3D5A9   | SUSD2   | IgG2a | Publikation (21)      |
| W7C6     | Unknown | IgG1  | Publikation (21)      |
| 58B1     | Unknown | IgG1  | Publikation (21)      |
| W5C4     | SUSD2   | IgG2b | Publikation (21, 37)  |
| W3C3     | Unknown | IgG1  | Publikation (23)      |
| F9-3C2F1 | Unknown | IgG1  | Publikation (21)      |
| HEK-3D6  | Unknown | IgG2a | Publikation (21)      |
| W1C3     | CD56    | IgG1  | Publikation (21)      |



|       |         |       |                  |
|-------|---------|-------|------------------|
| 2E4B4 | Unknown | IgG2a | Publikation (21) |
|-------|---------|-------|------------------|

### 2.1.6 Sekundärantikörper

Tabelle 3 Sekundärantikörper

| Name  | Hersteller, Referenz |
|---|----------------------|
| Rabbit Anti-Mouse-Biotin/<br>Kaninchen Anti-Maus-Biotin | Dako                 |
| Horse Anti-Mouse-FITC                                   | Vector Laboratories  |

### 2.1.7 Chemikalien, Reagenzien

Tabelle 4 Verwendete Chemikalien und Reagenzien für IHC

| Chemikalien, Reagenzien  | Hersteller       |
|--|------------------|
| Aceton   | Merck            |
| Avidin-Biotin-Kombination  | Dako             |
| DAB-Substrat (DAKO; Liquid DAB+)                                   | Dako             |
| BSA  | Sigma-Aldrich    |
| Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)                            | Invitrogen/Gibco |
| Dulbecco's Modified Eagle Medium Nutrient Mixture F-12 (DMEM/F-12) | Invitrogen/Gibco |
| Eagle Minimum Essential Medium (EMEM)                              | Invitrogen/Gibco |
| Eosin  | Fluka            |
| Ethanol  | Merck            |
| Fötales Kälber Serum (FCS)   | Biochrom         |
| Hämatoxylin  | Merck            |
| H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , Wasserstoffperoxid                 | Sigma-Aldrich    |
| L-Glutamin, c=200 mM   | Invitrogen/Gibco |

|  |                  |
|--|------------------|
| Natrium-Pyruvat, c=100 mM                    | Invitrogen/Gibco |
| NeoMount                                     | Merck            |
| PBS  | Biochrom         |
| Penicillin/Streptomycin-Mix (PS), c=10 mg/ml | Biochrom         |
| Propidiumiodid (PI)                          | Sigma-Aldrich    |
| Roticlear                                    | Roth             |
| Streptavidin/Biotin-HRP                      | Dako             |
| Trypanblau                                   | Invitrogen       |
| Trypsin                                      | Biochrom         |

### 2.1.8 Lösungen und Medien

**Tabelle 5** Verwendete Lösungen und Verdünnungen bei der IHC

| <b>Lösungen und Verdünnungen</b>  | <b>Hersteller/Herstellung</b>                                    |
|-----------------------------------|--|
| 1 % BSA                           | 0,5 g BSA in 50 ml PBS pH 7,4                                    |
| 3 % H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> | 30 % H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 1:10 in Aqua bidest           |
| FACS-Puffer                       | PBS mit 2 % FCS  |
| Zellkulturmedium DMEM             | DMEM mit 10 % FCS und 1 % PS                                     |
| Zellkulturmedium EMEM             | EMEM mit 10 % FCS, 1 % PS, 1 % Na-Pyruvat und 1 % L-Glutamin     |
| Zellkulturmedium EMEM             | EMEM mit 10 % FCS, 1 % PS, 1 % Na-Pyruvat und 1 % L-Glutamin     |
| Streptavidin/Biotin-HRP           | Beides 1:100 in PBS (30 Minuten bei Raumtemperatur präinkubiert) |

### 2.1.9 Apparate, Geräte und Software

**Tabelle 6** Verwendete Apparate, Geräte und Software bei der IHC und Durchflusszytometrie

| <b>Apparate, Geräte und Software</b>             | <b>Hersteller</b>          |
|--|----------------------------|
| 1-Kanal-Pipette, 10 µl, 100 µl, 1000 µl          | Eppendorf                  |
| 8-Kanal-Pipette                                  | Eppendorf                  |
| Brutschrank Hera Cell, 37°C, 5 % CO <sub>2</sub> | Kendro Laboratory Products |
| Countess® Cell Counter                           | Invitrogen                 |
| Durchflusszytometer, BD FACS Canto II            | BD Bioscience              |
| Foto-Software                                    | Axio Vision Rel. 4.8       |
| Gefrierschrank                                   | MS-Laborgeräte             |
| Kryotom Onkologie                                | Leica CM 3050              |
| Kühlschrank                                      | MS-Laborgeräte             |
| Mikroskop  | Olympus BX61               |
| Lichtmikroskop Axiovert                          | Carl Zeiss AG              |
| Pipettierhilfe Pipet Boy                         | Hirschmann Laborgeräte     |
| Spiegelreflexkamera Canon Eos 1000D              | Canon                      |
| Sterilbank Hera Save                             | Kendro Laboratory Products |
| Vakuum Absaugsystem Vacusafe Comfort             | IBS - INTEGRA Biosciences  |
| Vortexer   | IKA MS2 Mini-Shaker        |
| Wasserbad  | GFL                        |
| Zentrifuge 5415 R                                | Eppendorf                  |
| Zentrifuge 5804 R                                | Eppendorf                  |

**2.1.10 Bedarfsartikel****Tabelle 7 Verwendete Bedarfsartikel bei der IHC**

| <b>Material</b>                                 | <b>Hersteller</b>    |
|---|----------------------|
| 96 well-Platten, Flachboden                     | Corning Incorporated |
| Cell Counter Slides                             | Invitrogen           |
| Combitips Plus, 5 ml                            | Eppendorf            |
| Deckgläser                                      | R. Langenbrinck      |
| FACS-Röhrchen, 5 ml                             | BD Bioscience        |
| Falcon-Röhrchen, 15 ml, 50 ml                   | BD Bioscience        |
| Kryotommesser: R35, S35                         | Feather              |
| Objektträger Superfrost                         | R. Langenbrinck      |
| Pipetten: 10 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl        | Eppendorf Research   |
| Pipettenspitzen: 10 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl | Ratiolab             |
| Plastikpipetten, 5 ml, 10 ml, 25 ml             | Corning Incorporated |
| Reaktionsgefäße, 0,5 ml, 1,5 ml                 | Eppendorf            |
| Sterilfilter, 30 µm                             | Partec               |
| Zellkulturflaschen, 250 ml                      | BD Bioscience        |

**2.1.11 Material aus der Pathologie****Tabelle 8 Verwendetes Material aus der Pathologie**

| <b>Material aus der Pathologie, UKT</b>                    | <b>Hersteller</b>          |
|--|----------------------------|
| CryoFreezer Model CS 350                                   | CryoAnlagenbau GmbH        |
| CryoControl-Einheit, Tanküberwachung                       | Id (Agros) Ingenieurdienst |
| Deckgläser, 24x60 mm, 0,13-0,16 mm Dicke                   | R. Langenbrinck            |
| Eindeckmittel, Pertex per Hand oder mit dem Eindeckautomat | Medite                     |

|   |   |
|---|---|
| Eindeckautomat Permounter ® RSM2000 Coverslipping Machine       | Meissi, Großfirma Medite                  |
| Eosin G-Lösung 1 % 1000 ml wässrige Lösung, 10 g Eosin gelblich | Tübinger Universitätsapotheke             |
| Ethanol, ETO-10000-99-1   | 642 VG MEK/BIT.SAV-Liquid Production GmbH |
| Färbeautomat  | Varistain Automaten 24-3                  |
| Hämatoxylin, 2,5 l 1.09249.2500                                 | Merck                                     |
| Einbetten der Proben  | Tissue-Tek ®                              |
| Kryoröhrchen PP Y-Ster., 2 ml, Innengewinde-Schraubverschluss   | VWR                                       |
| Kryotom   | Leica CM 1900-1-1                         |
| Kryotommesser: C35, R35, S35                                    | Feather                                   |
| Objektträger (76x26 mm, 3x1 Inch)                               | R. Langenbrinck                           |
| Xylene, AnalaR Normapur 2, 28975.325                            | VWR                                       |

## 2.2 Methoden der IHC

### 2.2.1 Lagerung des primären Gewebes

Das aus dem OP gewonnene Primärmaterial wurde auf -80°C eingefroren oder in Stickstoff gelagert. Zum Schutz vor Gefrierbrand wurde es zuvor mit Tissue-Tek ® ummantelt.

### 2.2.2 Herstellung der Kryoschnitte

Im Kryotom wurden bei -20°C die Kryoschnitte mit einer Dicke von 5 µm erstellt. Das Fett musste teilweise aus Qualitätsgründen mit 8 µm geschnitten werden. Die weitere Lagerung der Kryoschnitte fand wieder bei -80°C statt.

### **2.2.3 Immunhistochemisches Färbeprotokoll**

Die Kryoschnitte wurden direkt nach der Entnahme aus dem -80°C Schrank für 3 min in Aceton fixiert, getrocknet und anschließend für 5 min mit PBS gewaschen. Die endogene Peroxidase wurde 10 min mit 3 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> blockiert und die Schnitte anschließend wieder 5 min mit PBS gewaschen. Für die Blockierung des endogenen Biotins wurden die Schnitte 10 min mit Avidin und 10 min mit Biotin inkubiert. Wiederum wurde 5 min mit PBS gewaschen und nachfolgend die Schnitte eine Stunde bei Raumtemperatur mit 1 % BSA/PBS blockiert. Die Inkubation des Primärantikörpers erfolgte bei +4°C über Nacht. Alle Antikörper, außer CD271, wurden unverdünnt mit 100 µl pro Schnitt eingesetzt. CD271 wurde zuvor 1:10 mit 1 % BSA/PBS verdünnt. Nach dreimaligem Waschen mit PBS für 5 min wurden der Sekundärantikörper Kaninchen Anti-Maus-Biotin 1:200 in 1 % BSA/PBS verdünnt und 45 min auf die Schnitte gegeben. Wiederum wurde dreimal mit PBS gewaschen und die Schnitte anschließend 30 min mit Streptavidin/Biotin-HRP inkubiert, welches zuvor 30 min präinkubiert wurde. Nach einem 5 min. andauernden Waschschrift folgte die Entwicklung mit DAB. Hierzu wurden jeweils pro Schnitt 100 µl DAB-Substrat mit 2 µl DAB eingesetzt und 5 min gefärbt. Nach einem kurzen Waschschrift in Wasser erfolgte die Gegenfärbung mit Hämatoxylin für 30 Sekunden. Danach wurden die Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert und mit NeoMount eingedeckt. Zur Absicherung wurde bei jeder immunhistochemischen Färbereihe eine Positivkontrolle mit Gewebe mit bekannter Expression durchgeführt, ebenso eine Negativkontrolle mit gleichem Gewebe ohne Primärantikörper.

### **2.2.4 Hämatoxylin- und Eosin-Färbungen**

Die Schnitte wurden 20 Sekunden in Hämatoxylin gefärbt und anschließend 3 min. in Leitungswasser gebläut. Die Dehydratation der Schnitte erfolgte in einer aufsteigenden Alkoholreihe mit einer abschließenden dreimaligen Inkubation in Roticlear für jeweils 3 min.. Nach dem Trocknen wurden die Schnitte mit

NeoMount eingedeckt. Zum Teil erfolgt die HE-Färbung der Schnitte auch mit dem Färbeautomaten Varistain.

### **2.2.5 Überprüfung der Zellmorphologie und Spezifität der IHC-Färbung**

Zur Bestimmung und Überprüfung der Zellmorphologie sowie der Einordnung einer spezifischen Färbung dienten Positiv- und Negativkontrollen, Normalgewebe, der Multi-tissue Block und eine Hämatoxylin-Eosin-Färbung des jeweiligen Gewebes.

### **2.2.6 Bewertung der IHC**

Mit einem Lichtmikroskop wurden die gefärbten Schnitte bewertet und fotografiert. In einem Protokoll für jeden Antikörper wurden die Resultate der Auswertungen festgehalten. Zur Bewertung der immunhistochemischen Färbereaktionen gelten folgende Kriterien: die Intensität der angefärbten Struktur, die angefärbte prozentuale Tumorfläche und die Art der Verteilung der angefärbten Tumorzellen.

### **2.2.7 Fotografische Dokumentation der IHC**

Die histologischen Gewebeschnitte wurden über das Mikroskop abfotografiert. Die Fotografien wurden in den Vergrößerungen x40, x100, x200 für die Ergebnisdokumentation aufgenommen und werden im Ergebnisteil wiedergegeben.

### **2.2.8 Kontrolle der Datenerhebung der IHC-Färbung**

Alle immunhistochemischen Bewertungen der Kryoschnitte wurden von der Autorin, Pathologen und onkologischen Internisten durchgeführt und untereinander diskutiert.

## **2.3 Methoden der Durchflusszytometrie**

### **2.3.1 Zellkulturarbeiten**

Alle Zellkulturarbeiten wurden unter einer Sterilbank durchgeführt. Diese wurde vor und nach dem Arbeiten mit 70 % Isopropanol gereinigt. Vor dem Gebrauch wurden alle Verbrauchs- und Zellkulturmaterialien desinfiziert, sterilisiert oder autoklaviert.

### **2.3.2 Aufbereitung von primären Sarkomgewebe**

Nach der operativen Entnahme von Sarkomgewebe wurde davon jeweils eine Probe genommen und aufgearbeitet. Dazu wurde das Tumorgewebe von Hand (mit Skalpell) oder mit dem *GentleMacs Dissociator* (Miltenyi Biotec GmbH) dissoziiert und zweimal mit PBS gewaschen. Anschließend wurde das Sarkomgewebe in eine Zellkulturflasche mit dem entsprechenden Zellkulturmedium überführt. Für die Lagerung der gewachsenen Zellen wurden diese in FCS mit 10 % DMSO bei -80°C eingefroren.

### **2.3.3 Aufbereitung der mesenchymalen Stammzellen**

Die Reste aus Beuteln von gesunden Knochenmarksspendern wurden ausgespült (21, 38), die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und in EMEM-Medium in Zellkulturflaschen überführt. Die MSCs adhären am Boden der Flasche und wachsen adhärent weiter. Für die weitere Lagerung der gewachsenen Zellen wurden diese in FCS mit 10 % DMSO bei -80°C eingefroren.

### **2.3.4 Auftauen von Sarkomzellen und MSC**

Die primären Sarkomzellen und die kryokonservierten Sarkomzelllinien wurden für die weitere Verwendung rasch aufgetaut und in jeweils ein Falcon-Röhrchen transferiert, das bereits mit 8 ml Zellkulturmedium gefüllt war. Je nach Sarkomzelltyp wurden DMEM, DMEM/F12 oder EMEM als Medium verwendet.



Die nun vorliegende verdünnte Zellsuspension wurde in einer Zentrifuge bei 1000 rpm für fünf Minuten zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Das Zellpellet wurde in 5 ml Zellkulturmedium resuspendiert, in eine Zellkulturflasche überführt und mit weiteren 13 ml Medium aufgefüllt.

### **2.3.5 Zellkultivierung der Sarkomzellen**

Die aufgetauten und in Zellkulturmedium überführten Sarkomzellen wurden im Brutschrank bei +37°C und 5 % CO<sub>2</sub>-Atmosphäre inkubiert. Einen Tag nach dem Ansetzen wurden Wachstum, Morphologie und Konfluenz mit dem Lichtmikroskop untersucht. Anschließende Kontrollen fanden alle 2-3 Tage statt. Bei geringer Konfluenz fand lediglich ein Mediumwechsel statt. Dazu wird das verbrauchte Medium abgesaugt und die adhärennten Zellen auf der Oberfläche der Zellkulturflasche mit 5 ml PBS gewaschen, um verbliebene Medium- und Zellreste zu entfernen.

Bei einer Konfluenz von 80-90 % fand zusätzlich eine Passagierung (Umsetzung) der Zellen für die Weiterzucht statt. Dazu wird das verbrauchte Medium abgesaugt und die adhärennten Zellen mit 5 ml PBS gewaschen. Anschließend wird 1 ml Trypsin für fünf Minuten zugegeben. Dabei wird der Zellrasen vom Boden der Zellkulturflasche gelöst und die Zellen wieder vereinzelt. Bei der Zugabe von neuem Medium wird Trypsin durch das enthaltene FCS wieder inaktiviert. Die Zellkultur wird entsprechend ihrer Wachstumsgeschwindigkeit geteilt und in frische, mit Medium gefüllte Zellkulturflaschen überführt.

### **2.3.6 Durchflusszytometrie**

Die Durchflusszytometrie ist eine Technik, mit der einzelne Zellen analysiert werden können. Hierbei können Größe, Granularität und Präsenz von Oberflächenmolekülen bestimmt werden. Für die Messung wird die Zellsuspension durch eine Mikrokanalküvette geleitet. So werden die Zellen einzeln an einem Laserstrahl vorbeigeleitet. Das entstehende Streulicht wird

von Photodetektoren ausgewertet. Die Seitwärtsstreuung (**Side Scatter** = SSC) ist ein Maß für die Zellgranularität. Die Vorwärtsstreuung (**Forward Scatter**, FSC) hängt vom Volumen der Zelle ab und liefert Informationen über die Zellgröße.

Zusätzlich zur Lichtstreuung können Fluoreszenzfarben gemessen werden. Dazu müssen vor der Analyse Antikörper, die mit einem Fluoreszenzfarbstoff (Fluorochrom) gelabelt wurden, an Oberflächenmolekülen der Zellen gebunden werden. Das von den Fluoreszenzfarbstoffen emittierte Licht gibt Auskunft über die Präsenz von Markern auf der Zelloberfläche.

Die gewachsenen Sarkomzellen wurden abtrypsiniert und mit PBS gewaschen. Die Antikörper-Inkubation erfolgte in einer 96-well Platte. Hierzu wurden jeweils 100000 Zellen für 15 min bei +4°C mit 100 µl Primärantikörper inkubiert, mit PBS gewaschen und nochmals 15 min mit Sekundärantikörper, Pferd Anti-Maus-FITC, inkubiert. Die Färbung von CD271 erfolgte mit einem direkt APC konjugierten Antikörper, so dass die Färbung mit Sekundärantikörper entfiel. Anschließend wurden die Zellen gewaschen und in einem Puffer, der 1 µg/µl Propidiumiodid enthielt, in FACS-Röhrchen überführt und analysiert. Propidiumiodid positive Zellen wurden von der Analyse ausgeschlossen.

Die Ergebnisse wurden in Form von Histogrammen oder dot plots dargestellt.

## **2.4 Auswahlkriterien der weiteren Validierung**

Nach der vergleichenden Analyse von Durchflusszytometrie und Immunhistochemie wurden acht Antikörper ausgewählt und an weiteren Sarkomen immunhistochemisch untersucht.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Erläuterung der Abkürzungen, Interpretationskriterien und Tabellen

##### 3.1.1 Abkürzungen der Sarkomtypen

Die Weichteilsarkome werden wie folgt abgekürzt: Leiomyosarkom (LMS), Liposarkom (LS), Rhabdomyosarkom (RMS).

##### 3.1.2 Erläuterung zum Multi tissue und Normalgewebe

Der Multi tissue (M.t.) ist ein künstlich erstellter Gewebeblock bestehend aus vier Gewebearten: Haut, glatter Darmwandmuskulatur, Mammakarzinom und Fett. Mit Normalgewebe ist das Ursprungsgewebe des jeweiligen Weichteiltumors gemeint.

##### 3.1.3 IHC-Färbung, Abkürzungen, Interpretationskriterien und Tabellen

Die Intensität beschreibt die Farbstärke der spezifischen Färbung der Tumorzellen durch den jeweiligen Antikörper. Die Farbintensität wird in drei Kategorien eingestuft: wenig (+), mittel (++), stark (+++).

Die Fläche bezieht sich auf die Tumorzellen, die eine spezifische Färbung durch den Antikörper aufzeigen. Die angefärbten Tumorflächen werden in vier Größeneinheiten eingeteilt: 1-25 %, 25-50 %, 50-75 %, 75-100 %.

Die Verteilung beschreibt die Anordnung und das Ausmaß der spezifischen Färbung der Tumorzellen. Die Verteilung des Färbemusters wird in drei Kategorien unterschieden: vereinzelt, diffus, homogen. Zudem wird angegeben ob das Zytoplasma (ZP) oder der Zellkern (ZK) angefärbt wurde.

In der Spalte Gefäße wird dokumentiert, ob eine Färbung der Gefäße unter dem jeweiligen Antikörper stattgefunden hat und in welcher Intensität dies ausgeprägt ist: wenig (+), mittel (++), stark (+++).

Das kurze Fazit in der stichwortartigen Ergebnisübersicht bezieht sich auf die spezifische Färbung der Tumorzellen bzw. der einzelnen Gewebearten des Multi tissue. Verwendete Abkürzungen: positiv (POS/pos.), negativ (NEG/neg.), spezifisch (SP), unspezifisch (USP) Kap. (Kapillare).

### 3.1.4 Aussagekraft der Kontrollen und Bewertungen

Bei jeder Färbereihe der Antikörper wurden eine Positiv- und eine Negativkontrolle angelegt. Die immunhistologischen Ergebnisse der Weichteiltumore wurden kritisch mit den Resultaten des Multi tissue und den jeweiligen H.E.-Schnitten gegenübergestellt. Die Erkenntnisse aus diesem Vergleich fließen in die Bewertung der Sarkome mit hinein.

## 3.2 Vorstellung der Antikörper

### 3.2.1 Übersicht der Antikörper

**Tabelle 9 Übersicht und Abkürzungen der monoklonalen Antikörper**

| Nr. | IHC – Antikörper | Antigen   |
|-----|------------------|---|
| 1.  | CD 271           | CD 271, NGFR= Nerve growth factor receptor, p75NTR= Low affinity neurotrophin receptor  |
| 2.  | CD 318C32        | CD318, CUB1= CDCP-1= CUB-domain-containing protein 1  |
| 3.  | W8B2B10          | TNAP= Tissue-nonspecific Alkaline Phosphatase, MSCA 1= mesenchymal stromal cell antigen-1   |
| 4.  | 97C5             | CD10, MME= membrane metallo-endoropeptidase<br>Calla-Antigen= Common acute lymphocytic leukemia antigen, NEP= neural endopeptidase, gp100 |
| 5.  | 28D4             | CD140b , PDGF- Receptor Beta= Platelet-derived  |

|     |            |   |
|-----|------------|---|
|     |            | growth factor subunit Beta  |
| 6.  | W3C4       | CD349 , Frizzled 9 (family of G protein-coupled receptor proteins)  |
| 7.  | HEK- 3D6C9 | Unbekannt   |
| 8.  | 104D2D1    | CD117, C-KIT= Stammzell-Rezeptor, SCFR= Mast/Stem cell growth factor receptor   |
| 9.  | W7C5F8     | CD109, Platelet activation factor   |
| 10. | W1C3       | CD 56   |
| 11. | W5C5       | SUSD2 = sushi domain containing 2   |
| 12. | W3D5A9     | SUSD2 = sushi domain containing 2   |
| 13. | 1G2-CD105  | CD105, Endoglin   |
| 14. | 24D2       | CD340, Her-2 neu, erbB-2= erythroblastic leukemia viral oncogene homolog2   |
| 15. | 67D2       | CD164, MGC-24= Multi-glycosylated core protein  |
| 16. | SE12C3     | CD172a , SIRP-Alpha= Signal-regulatory protein alpha-1  |
| 17. | W6B3C1     | CD133, PROML1= Prominin-like protein 1, AC-133= Prominin-like protein 1, Antigen AC133 homolog  |
| 18. | CH3A4A7    | CD344, Frizzled 4   |
| 19. | 67A4       | CD324, CDHE= ECAD= E-Cadherin= epithelial Calcium adhering, Cadherin 1, UVO= Uvomorulin , Arc 1= Activity-regulated cytoskeleton-associated protein |

|     |           |   |
|-----|-----------|---|
| 20. | 9C4       | CD326, EP-CAM= Epithelial cell adhesion molecule, TACSTD1= tumor-associated calcium signal transducer 1, EGP, EGP-2, Egp314, GA733-2, Ly74, TROP1, gp40 |
| 21. | 39D5      | CD56, N-CAM= neural cell adhesion molecule 1  |
| 22. | 58B1      | Unbekannt   |
| 23. | W5C4      | Unbekannt   |
| 24. | W3A1      | CD34, Mucosialin, Gp105-120, My10   |
| 25. | W8C3      | Unbekannt   |
| 26. | 2E4B4     | Unbekannt   |
| 27. | A3C6      | CD117   |
| 28. | F9- 3C2F1 | Unbekannt   |
| 29. | 57D2      | NPC= neural progenitor cell   |
| 30. | W7C6F10   | Unbekannt   |

Siehe Charakterisierung und Referenz der Antikörper im Kapitel 2 Material und Methoden unter 2.1.5 Antikörper.

### 3.2.2 Auswahlkriterien der angewandten Antikörper

Anhand der immunhistochemischen Färbungen der 30 Antikörper (Tabelle 11) in Vorversuchen innerhalb der Arbeitsgruppe mit den erläuterten Kriterien Kapitel 3.1 und der Durchflusszytometrie-Daten wurden acht Antikörper ausgewählt, die spezifisch an Tumorgewebe binden und an weiteren Sarkomen gefärbt.

### 3.3 Aufbau der Ergebnisdarstellung der ausgewählten Antikörper

#### 3.3.1 Aufbau der IHC-Ergebnisdarstellung

Die Erklärungen der Abkürzungen aus dem Kapitel 3.1 sind weiterhin für die Ergebnisdarstellung der acht Antikörper anwendbar.

Zusätzlich werden Angaben darüber gemacht, wie viele der angefärbten Sarkome-Schnitte je Tumorsubtyp positiv waren.

Vom Multi tissue werden die H.E.-Bilder (Abbildung 2) vorweg angeführt, um Wiederholungen der Bilder zu vermeiden. Diese H.E.-Fotos dienen zur Beurteilung der immunhistologisch angefärbten Multi tissue Schnitte, deren Fotos in den jeweiligen Resümees der Antikörper integriert sind.

Das Fazit in den Multi tissue Textabbildungen bezieht sich auf das genannte Hauptgewebe I. bis IV. (Haut, gl. Muskulatur, Fett. Mamma-Karzinom) welches in der zweiten Spalte senkrecht aufgeführt wird.

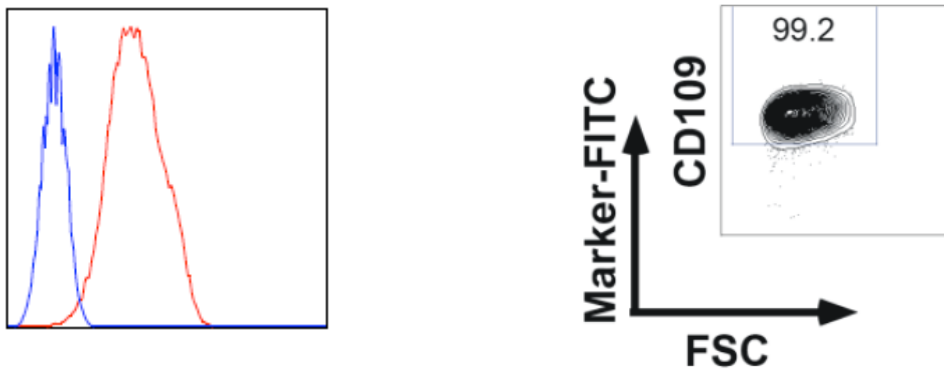
#### 3.3.2 Erläuterung der FACS-Analyse

Die Häufigkeitsverteilung der gemessenen Signale in der Durchflusszytometrie wird in einem Histogramm beschrieben (siehe Beispiel unten, Abb. 1). Die vertikale y-Achse gibt die Anzahl der Zellen wieder und die horizontal x-Achse zeigt die Intensität der Einzelmessungen. Wie im Methodenteil erwähnt, binden an die zu testenden Antikörper fluoreszenzmarkierte Sekundärantikörper. Die Fluoreszenzintensität bei einer Zellfärbung mit fluoreszenzmarkierten Antikörper ist direkt proportional zur Anzahl der vorhandenen Antigen-Antikörper-Bindungsstellen. In den hier aufgeführten Histogrammen steht die blaue Kurve für die IgG-Kontrolle um unspezifische Antikörper-Bindungen auszuschließen und die rote somit für die Antikörper-Färbung.

Im „Dot Plot“ findet eine graphische Punktauftragung statt. Es werden zwei unterschiedliche Sequenzen im Vergleich zueinander aufgetragen. Eine Substanz, hier der Marker-FITC wird, auf der vertikalen y-Achse aufgetragen und dagegen FSC auf der horizontalen x-Achse. Je mehr Antikörper gebunden

haben, desto größer ist das Signal auf der y-Achse. Die x-Achse gibt lediglich die Größe der Zellen wieder.

Die in der Arbeitsgruppe erhobenen FACS-Daten mit den jeweiligen Antikörpern auf den WTS beziehen sich beispielhaft auf ein Patientengewebe, daher kann durch individuelle Expressionsbeschaffenheit keine allgemeine Aussagekraft für jedes Weichteilsarkom abgeleitet werden.



**Abbildung 1** Beispiel mit CD109, links für Histogramme und rechts für Dot Plots



### 3.3.3 Fotos der Hämatoxylin-Eosin-Färbung des Multi tissue

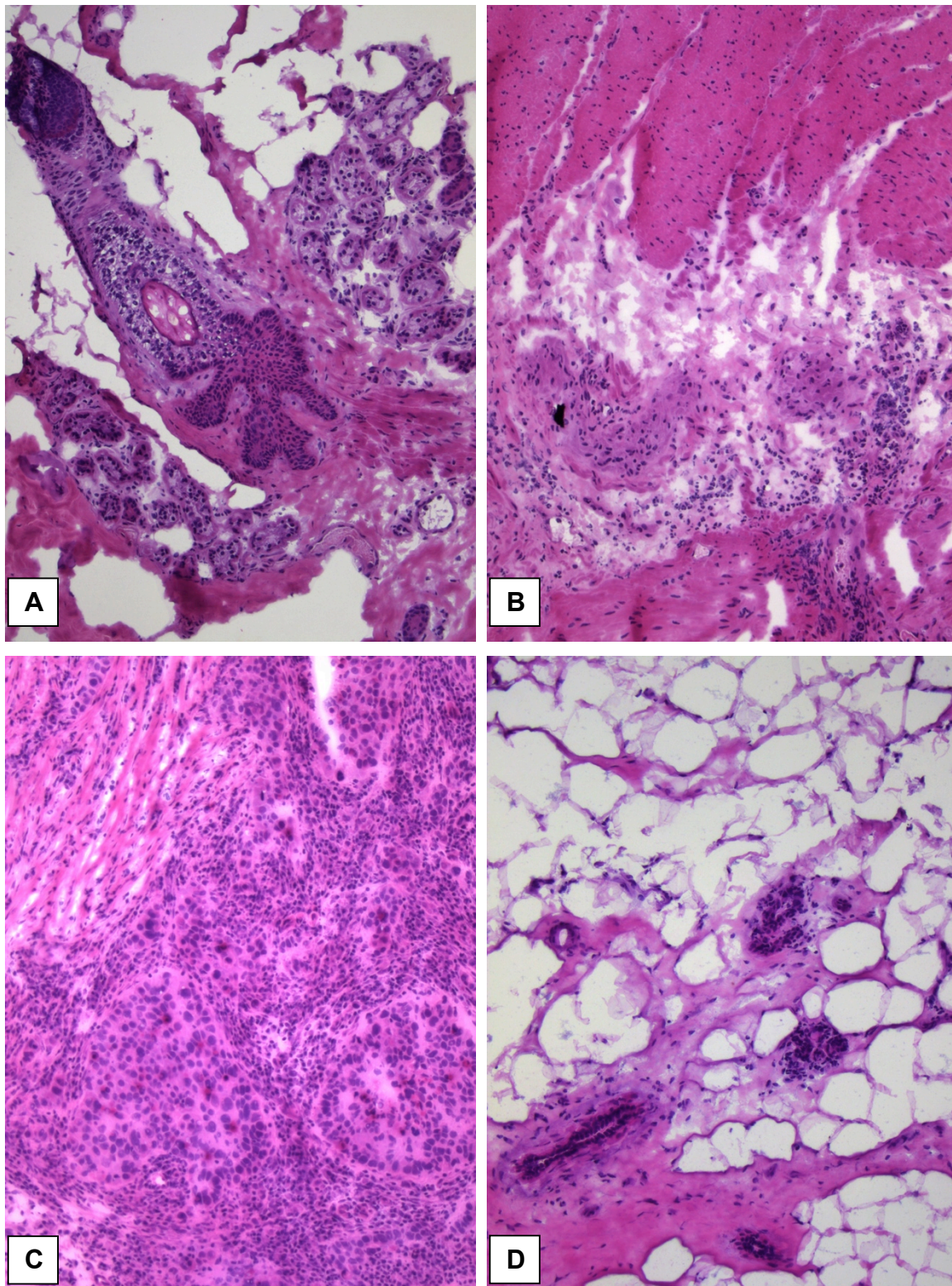


Abbildung 2 Fotos vom Multi tissue, H.E.-Färbung, Originalvergrößerung:

A) Haut x40, B) glatte Muskulatur x40, C) Mamma CA x40, D) Fett x40

### 3.3.4 Übersicht der ausgewählten Antikörper

Tabelle 10 Übersicht der acht ausgewählten Antikörper

| Nr.   | Nr. aus Liste<br>mit 30 AK | IHC – Antikörper | Antigen  |
|-------|----------------------------|------------------|--|
| I.    | (1)                        | CD271            | CD271, NGFR, p75NTR  |
| II.   | (2)                        | CD318C32         | CD318, CDCP-1, CUB1  |
| III.  | (3)                        | W8B2B10          | TNAP, „MSCA 1“   |
| IV.   | (6)                        | W3C4             | CD349, Frizzled 9  |
| V.    | (9)                        | W7C5F8           | CD109, JFN Y Rezeptor, 8A3, E123, Platelet activation factor |
| VI.   | (11)                       | W5C5             | sushi domain containing 2 (SUSD2)                            |
| VII.  | (12)                       | W3D5A9           | sushi domain containing 2 (SUSD2)                            |
| VIII. | (21)                       | 39D5             | CD56, N-CAM, NKH-1 Antigen                                   |

### 3.3.5 Präsentationsbeispiel der Ergebnisse

Die Ergebnisse der ausgewählten Antikörper werden auf den kommenden Seiten folgendermaßen dargestellt:

#### **Antikörper I – VIII**

*Resümee AK I - VIII*

Bewertung der IHC-Färbung auf Sarkomen

*Resümee AK I - VIII*

Fotos der IHC-Färbungen auf Sarkome

*Resümee AK I - VIII*

Bewertung der IHC-Färbung auf Multi tissue

*Resümee AK I - VIII*

Fotos der IHC-Färbung auf Multi tissue

*Resümee AK I - VIII*

Zusammenschau

*Resümee AK I - VIII*

Auswertung der FACS-Daten von Sarkomen

*Resümee AK I - VIII*

Zur besseren Orientierung befindet sich auf jeder Seite rechts oben am Rand eine Zeile mit „Resümee“ und dem jeweiligen Namen des Antikörpers für eine schnellere Übersicht.

### 3.4 Präsentation der Ergebnisse der acht Antikörper

#### 3.4.1 I. Antikörper CD271

##### Bewertung der IHC-Färbung auf Sarkomen

|      | Typen  | Intensität, Fläche, Verteilungsart  | Kurzes Fazit                    |
|------|--------|---|---------------------------------|
| I.   | LMS    | Negativ   | NEG                             |
| II.  | RMS    | Intensität und Fläche +++ 75-100 % 2 von 5, ++ 25-75 % 3 von 5, alle diffus-homogen, im Zytoplasma        | SP im ZP 5 von 5                |
| III. | LS     | Intensität und Fläche, +++ 50-75 % diffus 1 von 2, + - ++ 1-75 % vereinzelt-diffus 2 von 5, im Zytoplasma | SP im ZP 3 von 5<br>NEG 2 von 5 |
| IV.  | Gefäße | Intensität je Typ: LMS neg., RMS neg. - ++ teils Kapillaren, LS alle Gefäße                               | Teils NEG bis ++ Gefäße/Kap.    |

Im Vergleich zur FACS-Analyse zeigte sich auf allen untersuchten Leiomyosarkomen mit CD271 keine immunhistochemische Färbung. Der Antikörper CD271 zeigt ein einheitliches Färbemuster am Rhabdomyosarkom bei allen Patienten. Die Intensität beläuft sich zwischen mittel und stark, sowie über eine Tumورfläche von 25-100 %. Die Verteilung des spezifisch angefärbten Zytoplasmas zeigt sich in den Tumorzellen von diffus bis homogen. Im Gewebe von Patient acht befinden sich Drüsen der Urethra, deren Basalschicht wurde spezifisch in der IHC-Färbung mit starker Intensität angefärbt. Beim Liposarkom erscheint das Färbemuster mit CD271 uneinheitlicher als beim RMS. Mit einer Intensität von schwach bis stark wird das Zytoplasma der Tumorzellen angefärbt und die angefärbte Tumورfläche beläuft sich auf 1-25 % bis 50-75 %. Die Verteilung der Tumorzellen zeigt sich vereinzelt bis diffus über das Liposarkom. Die Gefäßfärbung mit CD271 variiert, im LMS neg., im RMS nur partiell die Kapillaren pos. und im LS alle Gefäße pos., Intensität zwischen schwach bis mittel.



Fotos der IHC-Färbungen auf Sarkome

Resümee AK CD271

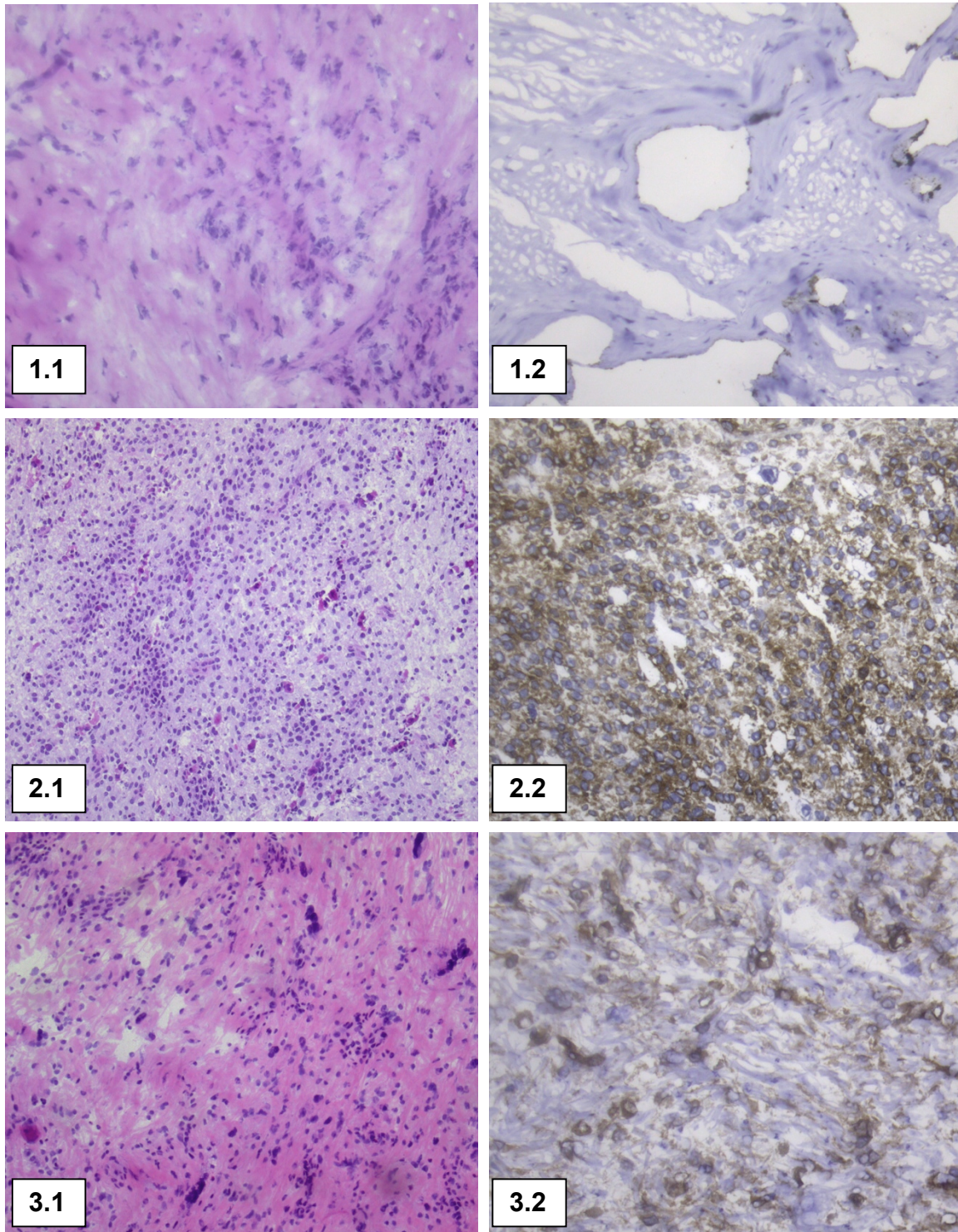


Abbildung 3 Fotos in Spalten: links H.E.-Färbung, rechts IHC-Färbung mit AK CD271

- 1) Reihe Leiomyosarkom, Patient 3, 1.1 x200 und 1.2 x100 Originalvergrößerung
- 2) Reihe Rhabdomyosarkom, Patient 9, 2.1 und 2.2 x100 Originalvergrößerung
- 3) Reihe Liposarkom, Patient 13, 3.1 x100 und 3.2 x200 Originalvergrößerung

Bewertung der IHC-Färbung auf Multi tissue*Resümee AK CD271*

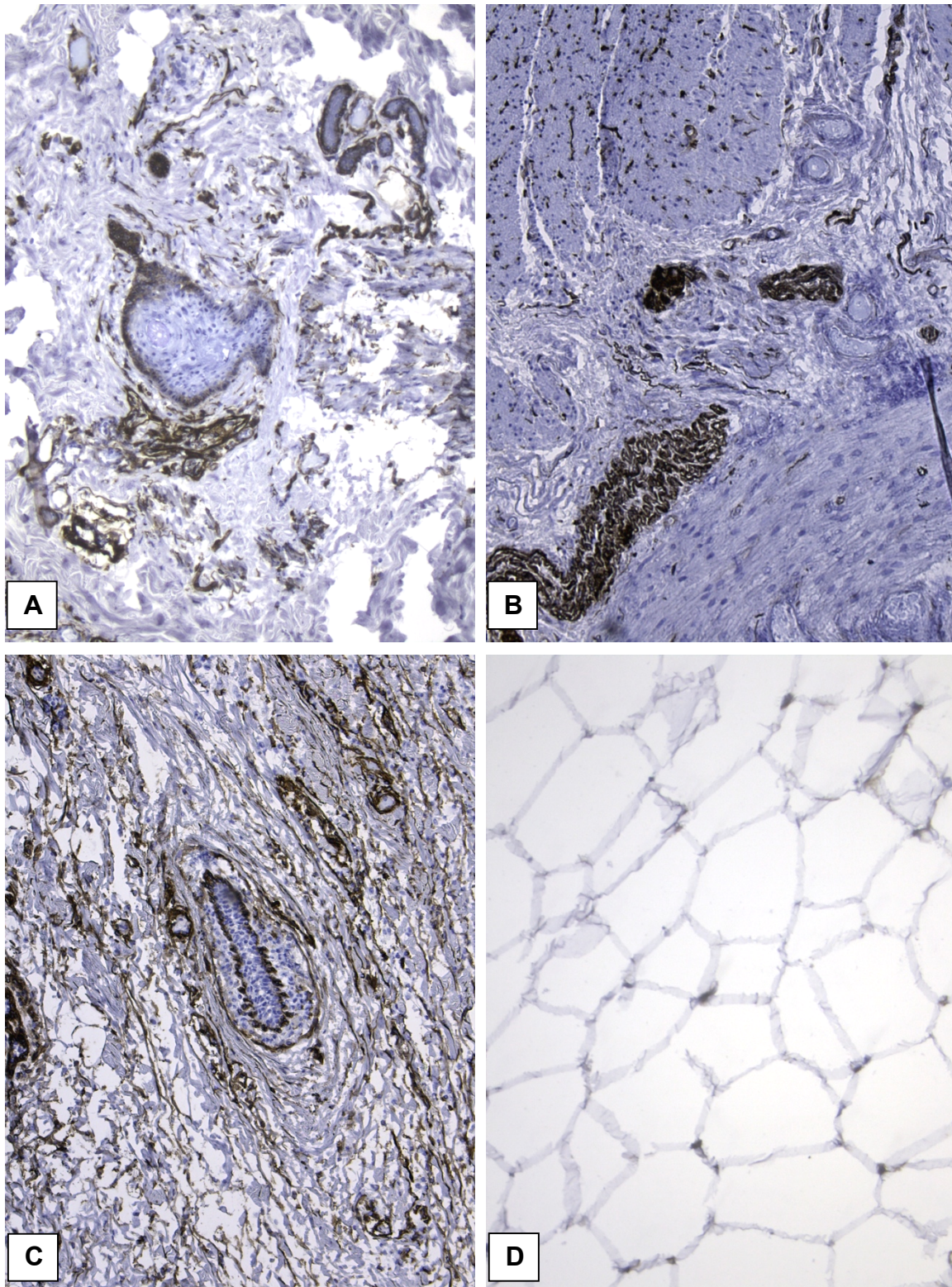
|      | <b>Multi Tissue</b> | <b>Intensität und Fläche</b>   | <b>Kurzes Fazit</b> |
|------|---------------------|--|---------------------|
| I.   | Haut                | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Basalschicht der Epidermis</li> <li>• +++ 100 % Zytoplasma</li> <li>• +++ 100 % Myoepithel</li> <li>• +++ Kapillaren</li> <li>• +++ Ganglion</li> <li>• + Nervenfaszikel</li> </ul> | Positiv             |
| II.  | Glatte Muskulatur   | <ul style="list-style-type: none"> <li>• +++ 50 % teils glatte Muskulatur</li> <li>• +++ Zytoplasma</li> </ul>   | Positiv             |
| III. | Fett                | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Fett negativ</li> <li>• +++ 100 % Myoepithel</li> </ul>   | Negativ             |
| IV.  | Mamma Karzinom      | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Mamma Karzinom negativ</li> <li>• +++ 100 % glatte Muskulatur der Gefäße</li> </ul>   | Positiv             |

In der Haut wurde die Basalschicht der Epidermis und das Zytoplasma mit einer Fläche von 100 % mit einer starken Intensität angefärbt. Ebenso wurden die Kapillaren und Ganglien mit starker Intensität gefärbt. Die Nervenfaszikel sind schwach positiv. Die Auswertung der glatten Muskulatur ergab eine Färbung teilweise bis zu 50 %, im Zytoplasma mit einer starken Intensität. Bei der Betrachtung des Fettgewebes wurde keine Färbung gefunden, aber das Myoepithel der Gefäße im Fett war mit einer starken Intensität angefärbt. Im Mamma-Karzinom wurden die Tumorzellen nicht gefärbt, die glatte Muskulatur jedoch bis zu 100 % positiv mit einer starken Intensität.



Fotos der IHC-Färbung auf Multi tissue

*Resümee AK CD271*



**Abbildung 4 Multi tissue, IHC-Färbung mit AK CD271, Originalvergrößerung:**

**A) Haut x40, B) glatte Muskulatur x40, C) Mamma CA x40, D) Fett x100**

Zusammenschau*Resümee AK CD271*

|      | <b>Gewebe-<br/>Typen</b> | <b>Immunhistochemie</b>                           | <b>FACS</b> |
|------|--------------------------|---|-------------|
| I.   | LMS                      | Negativ   | 66 %        |
| II.  | RMS                      | Spezifisch im Zytoplasma<br>5 von 5 RMS-Schnitten | 81 %        |
| III. | LS                       | Spezifisch im Zytoplasma<br>3 von 5 LS-Schnitten  | 15 %        |

Wie bereits für die IHC mit CD271 beschrieben, ist die Negativität der Färbung bei den Leiomyosarkomen sicher mit der interindividuellen Varianz zwischen den einzelnen Sarkomproben zu erklären. Auch bei der Durchflusszytometrie zeigen sich die Leiomyosarkome in Vorarbeiten der Arbeitsgruppe durchaus unterschiedlich. Hier sind Varianzen zwischen 1,5 % CD271 positiver Zellen bis hin zu 66 % positiver Zellen zu beobachten. Interessant ist, dass Vorhautfibroblasten in der Durchflusszytometrie keine Färbung für CD271 zeigen. Mesenchymale Stammzellen hingegen sind zu 33 % gefärbt. Bei den Liposarkomen zeigt sich ein ähnliches Bild wie bei den Leiomyosarkomen. Auch sie zeigen eine hohe interindividuelle Varianz von keinen positiven Zellen bis hin zu vereinzelt-diffus mit leichter bis stark angefärbter Tumorfläche von bis zu 75 % in der Immunhistochemie, in der FACS-Analyse waren ca. 15 % positive Zellen messbar. Lediglich die Rhabdomyosarkome zeigen in der IHC eine durchgängige Färbung bei mittlerer bis starker Intensität mit einer vereinzelt bis diffusen Verteilung über eine Tumorfläche von 25-75 % für den AK CD271. Auch in der Durchflusszytometrie waren 81 % positive Zellen im RMS detektierbar.



## Auswertung der FACS-Daten von Sarkomen

## Resümee AK CD271

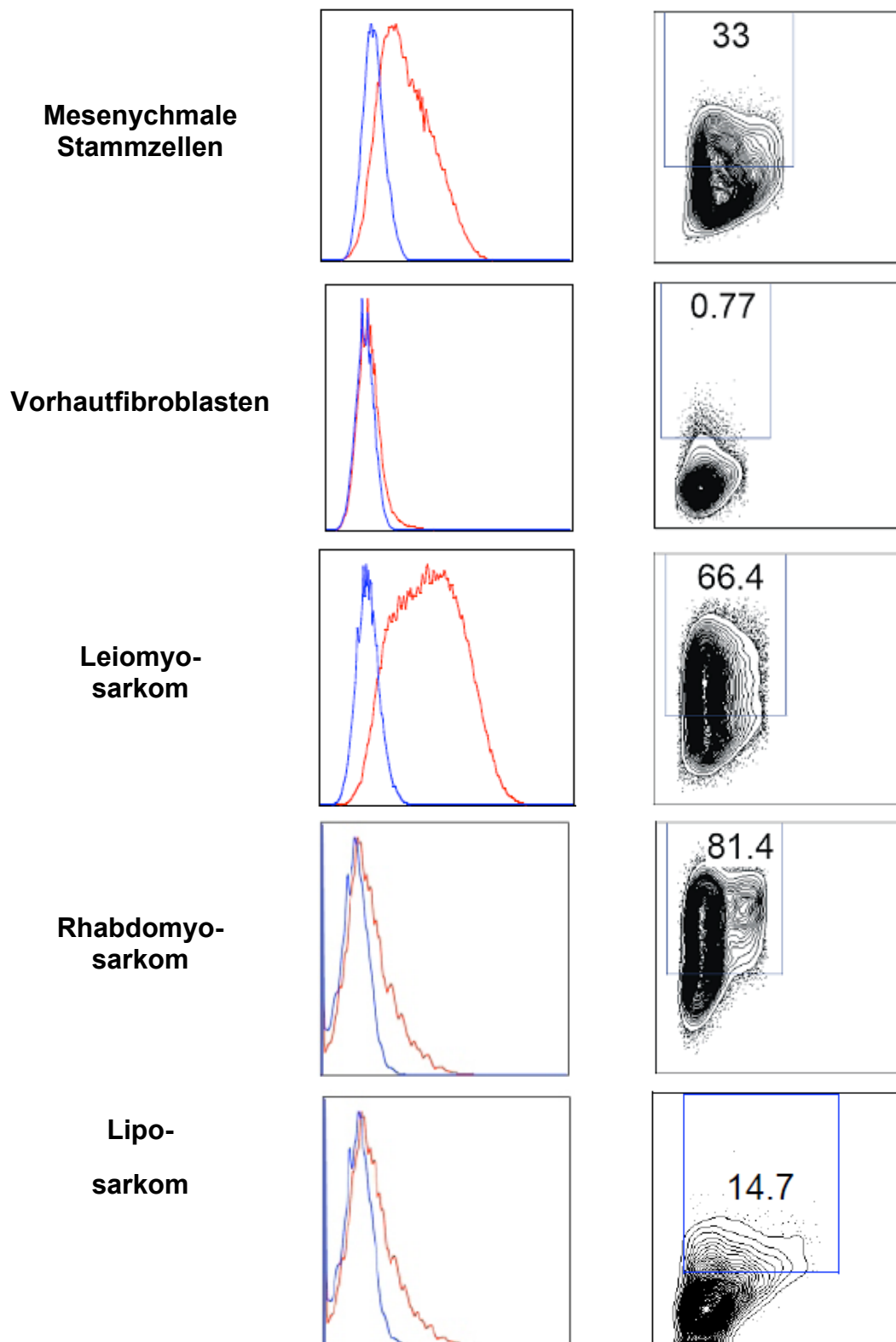


Abbildung 5 AK CD271, mit der Durchflusszytometrie erhobene Daten; links von oben, Zelltyp: mesenchymale Stammzellen, Vorhautfibroblasten, LMS, RMS, LS; mittig Histogramme und rechts Dot Plots mit Angabe der Marker positiven Zellen in Prozent (1)

### 3.4.2 II. Antikörper CD318C32

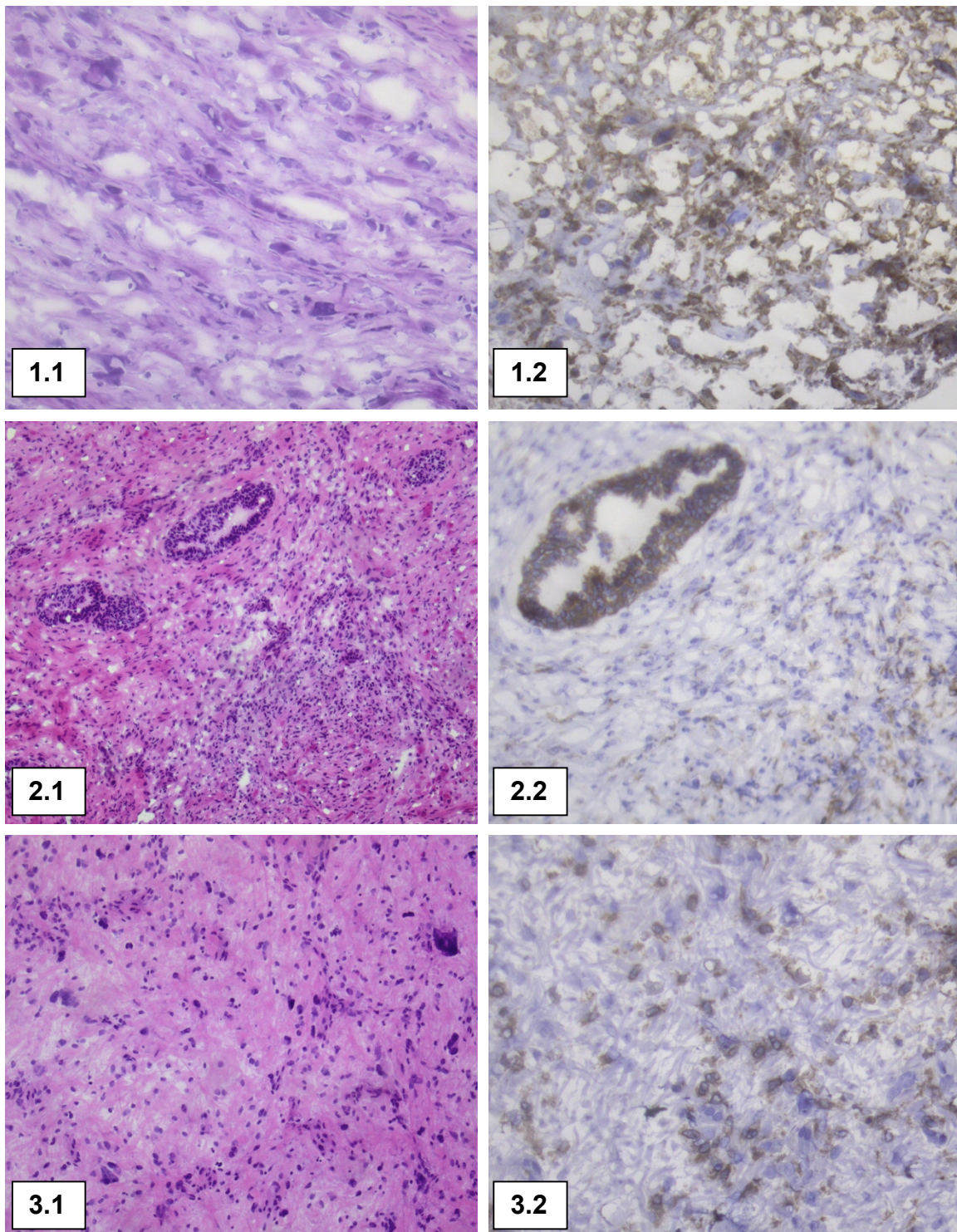
#### Bewertung der IHC-Färbung auf Sarkomen

|      | Typen  | Intensität, Fläche, Verteilungsart   | Kurzes Fazit                    |
|------|--------|--|---------------------------------|
| I.   | LMS    | Intensität +++, Fläche 50-100 % 3 von 4, + 1-25 % 1 von 4, alle diffus-homogen, im Zytoplasma      | SP im ZP 4 von 4                |
| II.  | RMS    | Intensität ++, Fläche 1-25 % 3 von 5, 50-100 % 2 von 5, alle diffus-homogen, im Zytoplasma         | SP im ZP 5 von 5                |
| III. | LS     | Intensität ++ - +++, Fläche 50-75 % 3 von 5, ++ 1-25 % 1 von 5, alle diffus-homogen, im Zytoplasma | SP im ZP 4 von 5<br>NEG 1 von 5 |
| IV.  | Gefäße | Negativ, teilweise schwer zu beurteilen  | NEG                             |

Die spezifische Färbung am Zytoplasma des Leiomyosarkoms zeigt in drei Fällen eine starke Intensität mit einer angefärbten Tumorfläche von 50-100 %. In einem einzelnen Schnitt war die Intensität schwach mit 1-25 % angefärbter Tumorzellen. Die gefärbten Tumorzellen waren diffus und homogen verteilt. Im Rhabdomyosarkom wurde das Zytoplasma spezifisch mit einer mittleren Intensität angefärbt. Die betreffende Tumorfläche beträgt 50 bis 100 % bei zwei IHC-Schnitten und bei drei weiteren 1 bis 25 % mit einer Verteilung von vereinzelt, diffus und homogen. Die im H.E.-Schnitt identifizierten Drüsen nahe der Urethra waren positiv mit einer Färbestärke von schwach bis mittel. Die Tumorzellen des Liposarkoms wurden spezifisch im Zytoplasma mit einer mittleren bis starken Intensität angefärbt. Die durch den Antikörper gefärbte Tumorfläche beträgt in drei Fällen 50 bis 75 %, sowie in einem Fall 1 bis 25 %. Das Verteilungsmuster zeigt sich von diffuser bis homogener Struktur. Die Gefäße wurden durch den Antikörper nicht gefärbt.

Fotos der IHC-Färbungen auf Sarkomen

*Resümee AK CD318C32*



**Abbildung 6** Fotos in Spalten: links H.E.-Färbung, rechts IHC-Färbung mit AK CD318C32

**1) Reihe Leiomyosarkom, Patient 1, 1.1 und 1.2 x200 Originalvergrößerung**

**2) Reihe Rhabdomyosarkom, Patient 8, 2.1 x100 und 2.2 x100 Originalvergrößerung**

**3) Reihe Liposarkom, Patient 13, 3.1 und 3.2 x200 Originalvergrößerung**

Bewertung der IHC-Färbung auf Multi tissue*Resümee AK CD318C32*

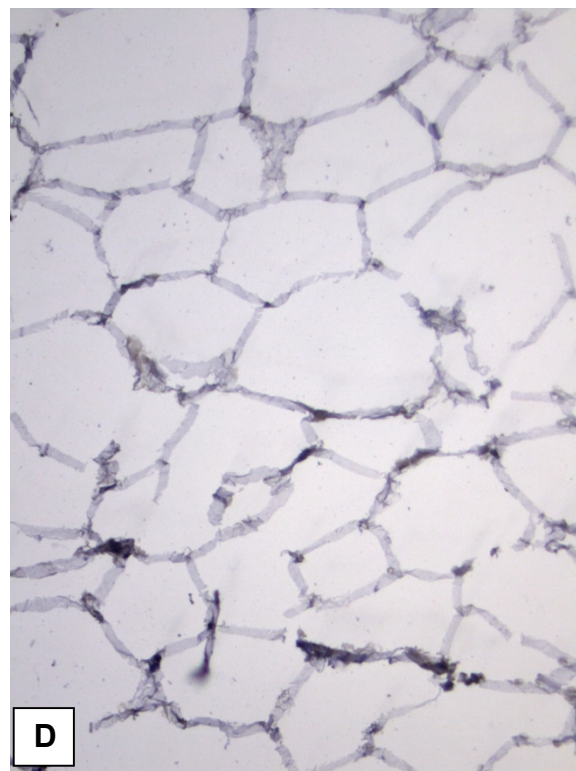
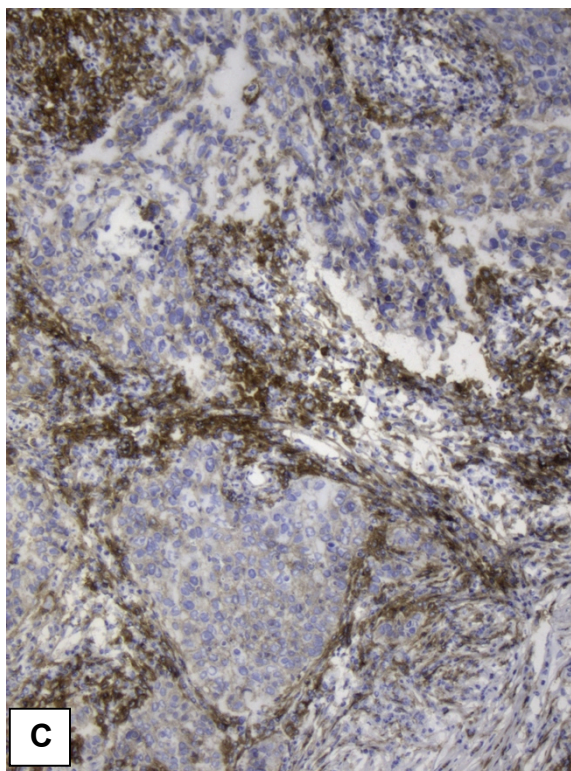
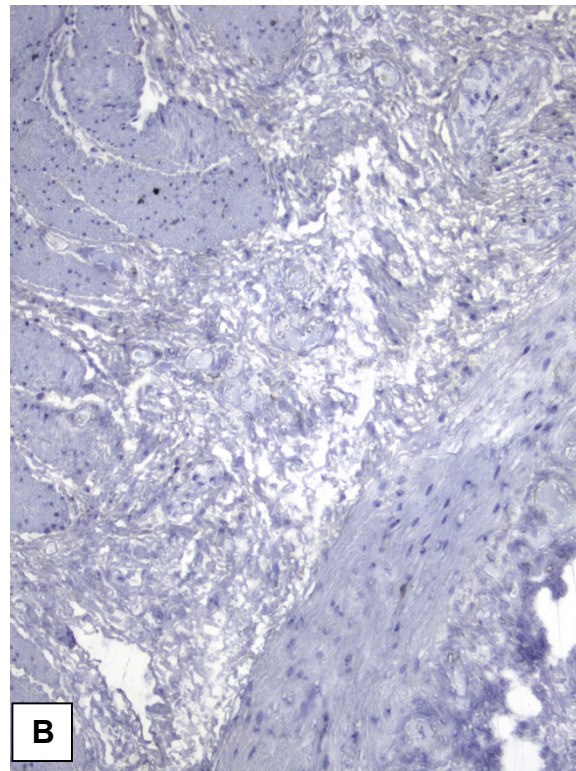
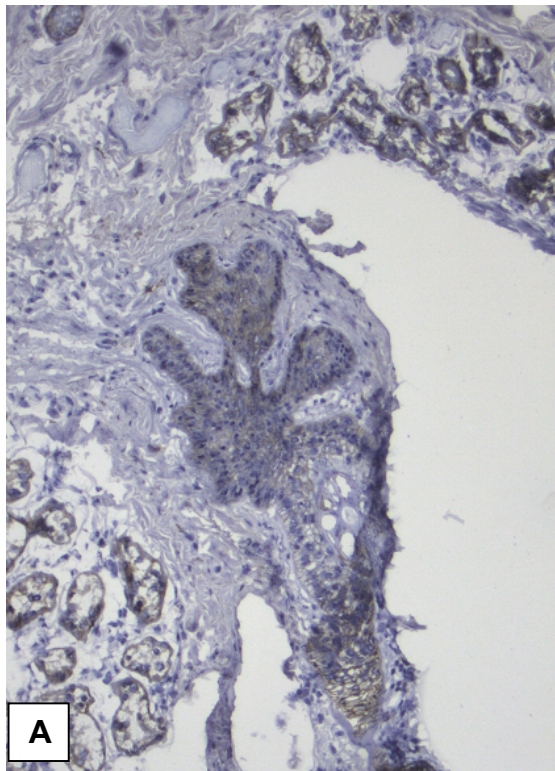
|      | <b>Multi Tissue</b> | <b>Intensität und Fläche</b>   | <b>Kurzes Fazit</b> |
|------|---------------------|--|---------------------|
| I.   | Haut                | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Epidermis: Basal, +++ 50-75 % Spinosum</li> <li>• 75-100 % Epithel der Hautanhangsdrüsen</li> </ul> | Positiv             |
| II.  | Glatte Muskulatur   | <ul style="list-style-type: none"> <li>• 1-2 % glatter Muskulatur, + Zytoplasma</li> </ul>   | Positiv             |
| III. | Fett                | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Fett negativ</li> </ul>   | Negativ             |
| IV.  | Mamma Karzinom      | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Mamma Karzinom positiv</li> <li>• +++ Desmoplastisches Stroma</li> </ul>                            | Positiv             |

Die Bewertung der Epidermis der Haut ergab eine starke Färbung der Basal- und Stachelzellschicht mit einer Fläche von 50 bis 75 %. Außerdem zeigte sich ein positives Epithel der Hautanhangsdrüsen bei einem prozentualen Anteil von 75-100 % bezogen auf die gesamten Hautanhangsdrüsen. Im Abschnitt der glatten Muskulatur konnte eine prozentuale Färbung von 1-2 % erkannt werden, das Zytoplasma zeigt eine schwache Intensität. Die Auswertung des Fettgewebes ergab keine Färbungen und ist somit negativ. Bei der Beurteilung des Mamma-Karzinoms wurden die Tumorzellen spezifisch angefärbt. Besonders aufgefallen ist hier die stark positive spezifische Färbung des desmoplastischen Stromas.



Fotos der IHC-Färbung auf Multi tissue

*Resümee AK CD318C32*



**Abbildung 7 Multi tissue, IHC-Färbung mit AK CD318C32, Originalvergrößerung:**

**A) Haut x40, B) glatte Muskulatur x40, C) Mamma CA x40, D) Fett x100**

Zusammenschau*Resümee AK CD318C32*

|      | <b>Gewebe-<br/>Typen</b> | <b>Immunhistochemie</b>                           | <b>FACS</b> |
|------|--------------------------|---|-------------|
| I.   | LMS                      | Spezifisch im Zytoplasma<br>4 von 4 LMS-Schnitten | 40 %        |
| II.  | RMS                      | Spezifisch im Zytoplasma<br>5 von 5 RMS-Schnitten | 8 %         |
| III. | LS                       | Spezifisch im Zytoplasma<br>4 von 5 LS-Schnitten  | 1 %         |

In der IHC-Färbung sind die LMS einheitlich diffus-homogen mit einer starken Intensität im Zytoplasma spezifisch durch CD318C32 in allen vier Fällen mit einer Fläche von 1-100 % angefärbt, was am ehesten durch eine individuelle Expressionsdifferenz zu erklären ist. In der FACS-Analyse der LMS zeigten sich 40 % der Zellen CD318C31, aber nur ca. 8 % der RMS-Zellen positiv. Jedoch sind in der IHC-Färbung alle fünf RMS diffus-homogen im Zytoplasma spezifisch angefärbt mit einer mittleren Intensität und Fläche von 1-100 %. In vier von fünf Fällen ist das Zytoplasma der LS mit einer mittleren bis starken Intensität spezifisch diffus-homogen mit 1-75 % der Fläche gefärbt, in der Durchflusszytometrie wurden knapp 1 % der Zellen als positiv detektiert. Ebenso sind nur ca. 2 % der mesenchymalen Stammzellen und ca. 5 % der Vorhautfibroblasten CD318-positiv. Der AK gegen CD318 erscheint in der IHC-Anwendung robuster und sensitiver als in der Durchflusszytometrie. Des Weiteren scheint es Unterschiede zwischen der zytoplasmatischen und der Oberflächenexpression zu geben. Aufgrund der geringen Probenanzahl der einzelnen Entitäten und fehlender Daten des weiteren Verlaufs bzw. des Therapieansprechens können keine Schlüsse darüber gezogen werden, ob sich aus dem Verhältnis Oberflächen- zu zytoplasmatischer Expression eine Verlaufsprognose oder ein Therapieansprechen ableiten lässt.

## Auswertung der FACS-Daten von Sarkomen

## Resümee AK CD318C32

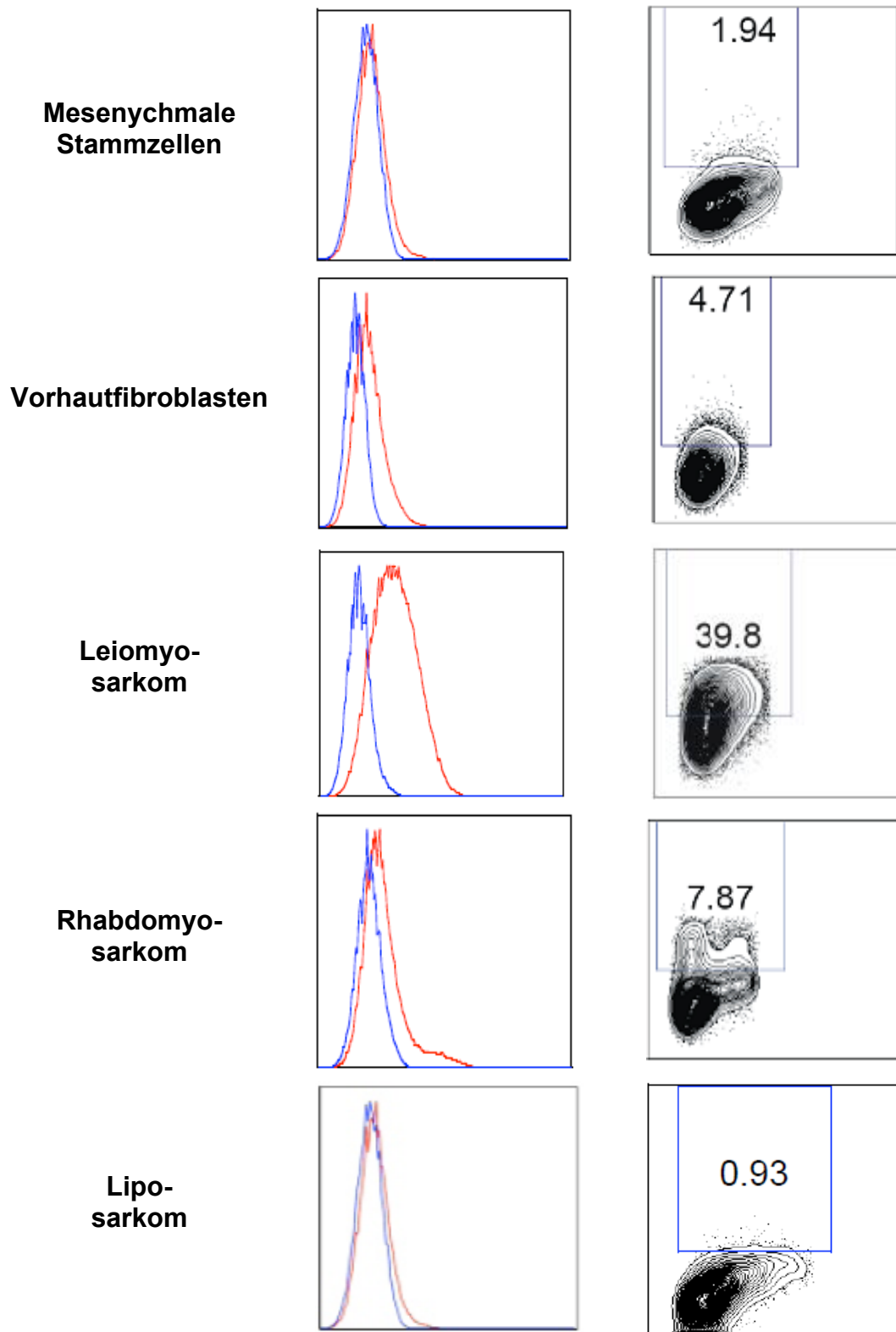


Abbildung 8 AK CD318C32, mit der Durchflusszytometrie erhobene Daten; links von oben, Zelltyp: mesenchymale Stammzellen, Vorhautfibroblasten, LMS, RMS, LS; mittig Histogramme und rechts Dot Plots mit Angabe der Marker positiven Zellen in Prozent (1)

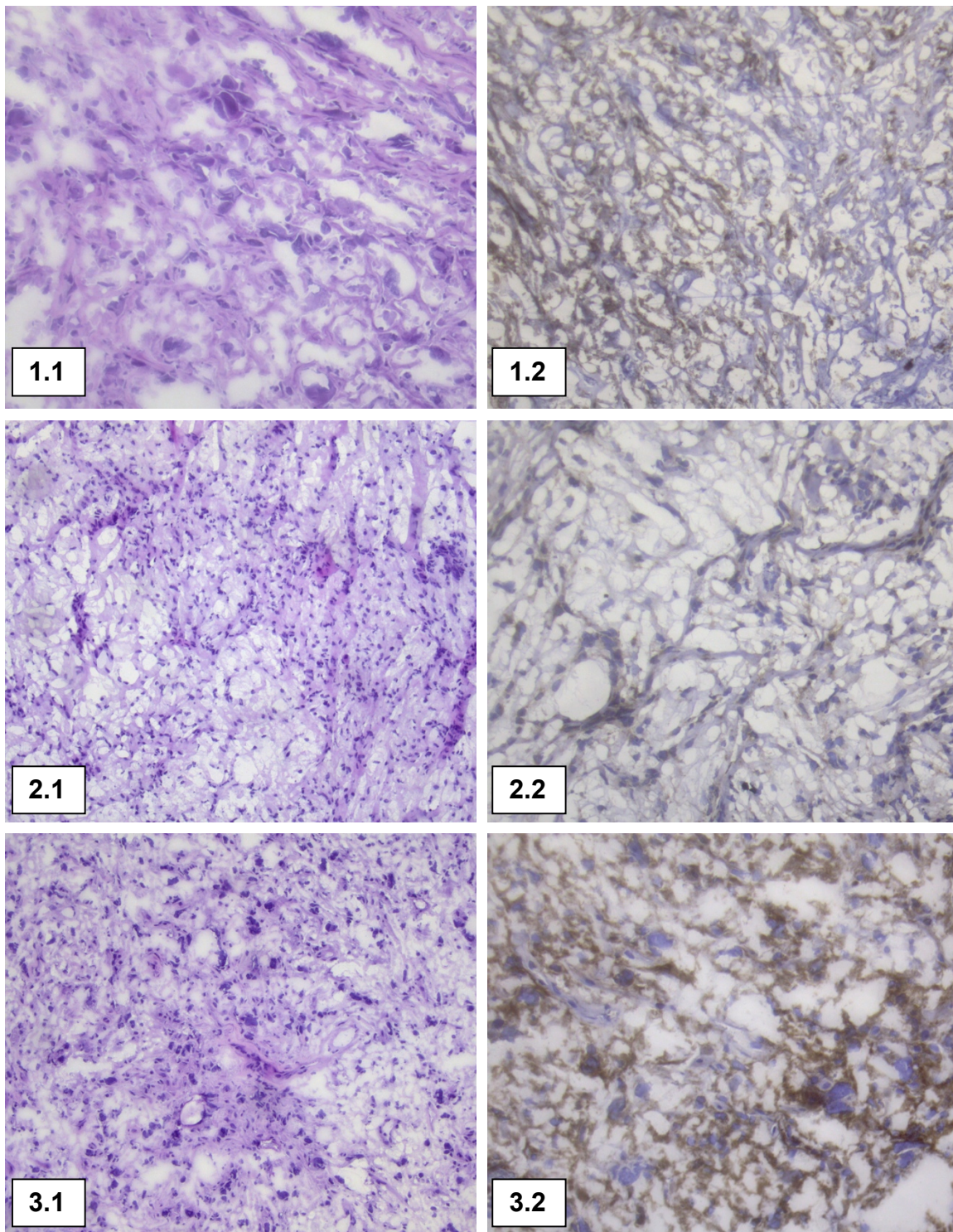
### 3.4.3 III. Antikörper W8B2B10

#### Bewertung der IHC-Färbung auf Sarkomen

|      | Typen  | Intensität, Fläche, Verteilungsart   | Kurzes Fazit                    |
|------|--------|--|---------------------------------|
| I.   | LMS    | Intensität ++ 50-75 % diffus<br>1 von 4, + 1-25 % vereinzelt 1 von 4,<br>im Zytoplasma                                     | SP im ZP 2 von 4<br>NEG 2 von 4 |
| II.  | RMS    | Intensität +, Fläche 1-25 % vereinzelt<br>2 von 5, im Zytoplasma   | SP im ZP 2 von 5<br>NEG 3 von 5 |
| III. | LS     | Intensität und Fläche, +++ 75-100 % 1 von<br>5, ++ - +++ 25-50 % 3 von 5, + 1-25 %<br>1 von 5, alle homogen, im Zytoplasma | SP im ZP 5 von 5                |
| IV.  | Gefäße | Intensität + - ++ positiv 2 von 15,<br>negativ 13 von 15   | NEG 13 von 15<br>POS 2 von 15   |

Die Färbung von n = 4 Fällen der LMS fiel zur Hälfte negativ aus. Die andere Hälfte wurde mit einer schwachen bis mittleren Stärke im Zytoplasma spezifisch angefärbt. Bei den zwei positiven Gewebeschnitten wurde die Tumorfläche einmal vereinzelt 1-25 % und das andere Mal diffus 50-75 % angefärbt. Der Antikörper färbte auf dem Rhabdomyosarkom vereinzelt bei schwacher Intensität das Zytoplasma spezifisch an. Die gefärbten Sarkomzellen haben einen Anteil von 1 bis 25 % der gesamten Tumorfläche. Das Liposarkom wurde homogen im Zytoplasma der Tumorzellen mit einer schwachen bis starken Intensität angefärbt. Die prozentuale Primärantikörperbindung an der Tumorfläche variiert. Drei Liposarkome wurden mit einer Fläche von 25-50 % angefärbt, eines mit 75-100 % und ein weiteres mit 1-25 %. Die Gefäße präsentierten sich in der Regel negativ, bei zwei Schnitten waren sie positiv bei schwacher bis mittlerer Intensität.



Fotos der IHC-Färbungen auf Sarkomen*Resümee AK W8B2B10*

**Abbildung 9** Fotos in Spalten: links H.E.-Färbung, rechts IHC-Färbung mit AK W8B2B10

**1) Reihe Leiomyosarkom, Patient 1, 1.1 und 1.2 x200 Originalvergrößerung**

**2) Reihe Rhabdomyosarkom, Patient 6, 2.1 x100 und 2.2 x200 Originalvergrößerung**

**3) Reihe Liposarkom, Patient 11, 3.1 und 3.2 x200 Originalvergrößerung**

Bewertung der IHC-Färbung auf Multi tissue*Resümee AK W8B2B10*

|      | <b>Multi Tissue</b> | <b>Intensität und Fläche</b>                      | <b>Kurzes Fazit</b> |
|------|---------------------|---|---------------------|
| I.   | Haut                | • Haut negativ                                    | Negativ             |
| II.  | Glatte Muskulatur   | • Glatte Muskulatur negativ                       | Negativ             |
| III. | Fett                | • Fett negativ<br>• +++ Drüsen Epithelzellschicht | Positiv             |
| IV.  | Mamma Karzinom      | • Mamma Karzinom negativ                          | Negativ             |

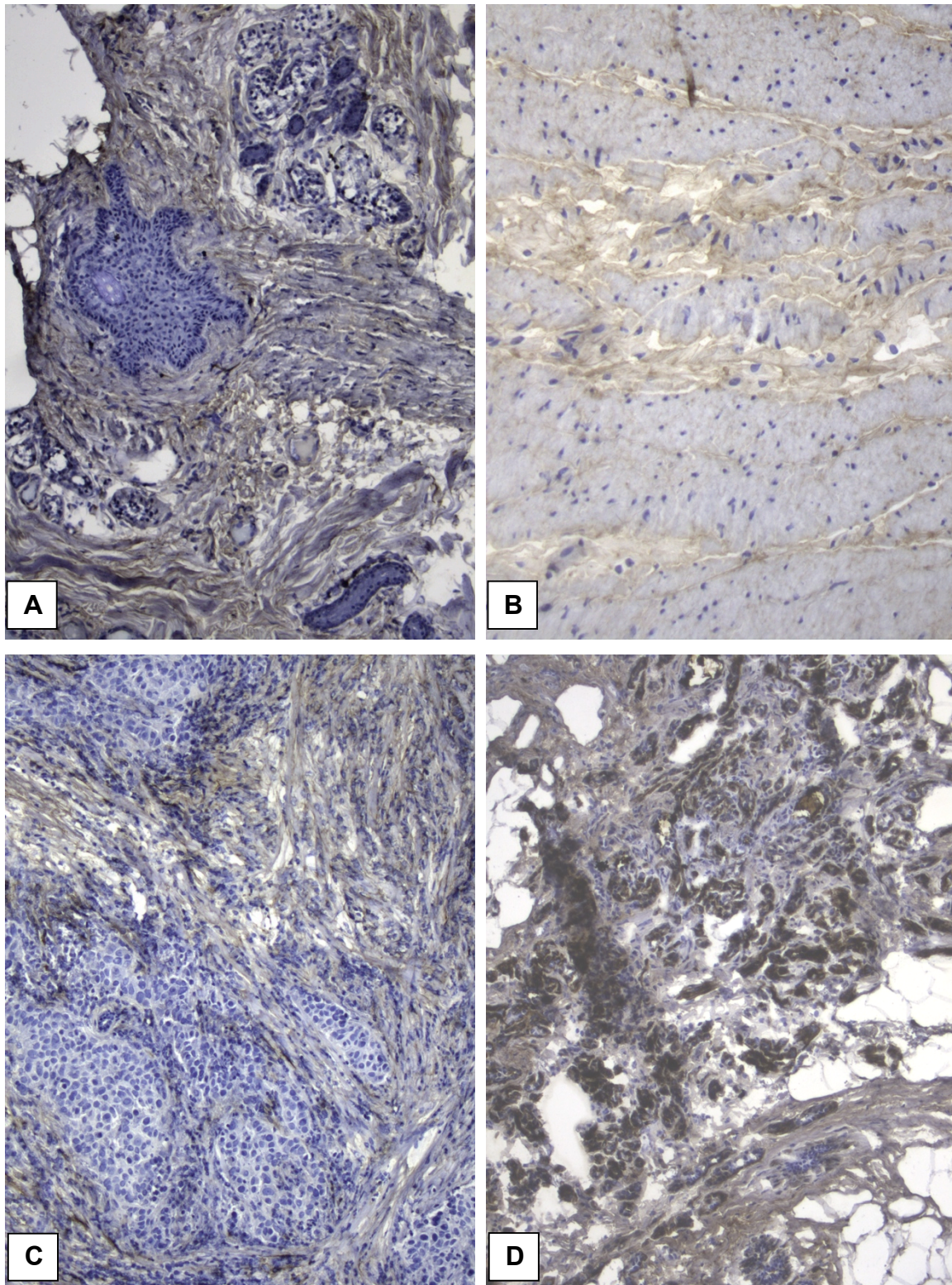
Fazit:

Bei der Betrachtung der Haut mit ihren Hautanhangdrüsen konnte keine Färbung festgestellt werden, ebenso bei der glatten Muskulatur aus dem Darm. In der Beurteilung des Fettgewebes konnte man deutlich eine starke Färbung der Epithelzellschicht der Drüsen erkennen. Fettzellen selbst wurden mit diesem Antikörper nicht angefärbt. Die Tumorzellen des Mamma-Karzinoms sind nicht angefärbt worden. Ebenso sind keine Gefäße gefärbt worden.



Fotos der IHC-Färbung auf Multi tissue

*Resümee AK W8B2B10*



**Abbildung 10 Multi tissue, IHC-Färbung mit AK W8B2B10, Originalvergrößerung:**

**A) Haut x40, B) glatte Muskulatur x100, C) Mamma CA x40, D) Fett x100**

Zusammenschau*Resümee AK W8B2B10*

|      | <b>Gewebe-<br/>Typen</b> | <b>Immunhistochemie</b>                           | <b>FACS</b> |
|------|--------------------------|---|-------------|
| I.   | LMS                      | Spezifisch im Zytoplasma<br>2 von 4 LMS-Schnitten | 11 %        |
| II.  | RMS                      | Spezifisch im Zytoplasma<br>2 von 5 RMS-Schnitten | 71 %        |
| III. | LS                       | Spezifisch im Zytoplasma<br>5 von 5 LS-Schnitten  | 40 %        |

Der AK W8B2B10 (TNAP) konnte in zwei Fällen die Leiomyosarkome mit einer unterschiedlichen Verteilung von vereinzelt bis diffus bei mittlerer Intensität das Zytoplasma spezifisch an einer Fläche von 1-75 % färben. Parallel ergab sich in der Durchflusszytometrie lediglich ein positives Ergebnis von 11 % der LMS-Zellen mit dem AK W8B2B10. In der FACS-Analyse wurde der AK W8B2B10 zu ca. 70 % positiv an das RMS gebunden. In der IHC-Auswertung waren nur zwei Präparate der Rhabdomyosarkome im Zytoplasma spezifisch positiv mit einer schwachen Intensität bei geringer Fläche und einer vereinzelter Verteilung. Die Ergebnisse beider Methoden waren nicht deckungsgleich. Bei den Liposarkomen wurde eine spezifische homogene Färbung des Zytoplasmas in allen IHCs mit einer einheitlichen starken Intensität und stark variierendem Flächenanteil von 1-100 % nachgewiesen. Hierzu zeigt sich in den FACS-Auswertungen eine positive Färbung der LS von ca. 40 %. Eine große Varianz der individuellen Expression der TNAP-Bindungsstellen ist anzunehmen. Die mesenchymalen Stammzellen wurden in der Durchflusszytometrie nur zu ca. 11 % positiv detektiert und die Vorhautfibroblasten lediglich mit 1 %. Insgesamt ist TNAP ein mit beiden Untersuchungsmethoden detektierbares Antigen, das auf fast allen getesteten Tumorproben exprimiert war. Die weitere Entwicklung als diagnostischer Marker ist potentiell interessant.

## Auswertung der FACS-Daten von Sarkomen

## Resümee AK W8B2B10

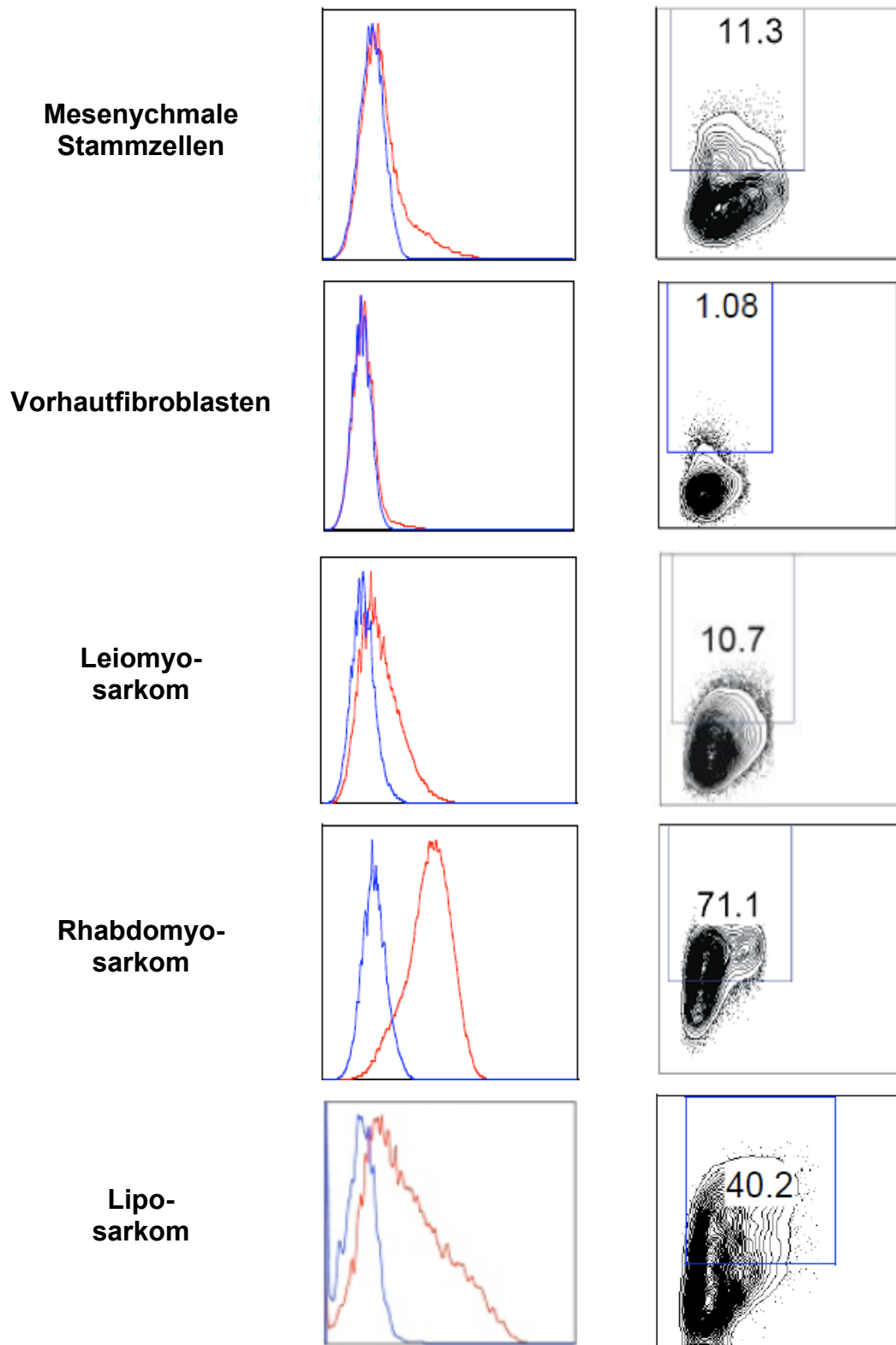


Abbildung 11 AK W8B2B10, mit der Durchflusszytometrie erhobene Daten; links von oben, Zelltyp: mesenchymale Stammzellen, Vorhautfibroblasten, LMS, RMS, LS; mittig Histogramme und rechts Dot Plots mit Angabe der Marker positiven Zellen in Prozent (1)

### 3.4.4 IV. Antikörper W3C4-CD349

#### Bewertung der IHC-Färbung auf Sarkomen

|      | Typen  | Intensität, Fläche, Verteilungsart  | Kurzes Fazit                    |
|------|--------|---|---------------------------------|
| I.   | LMS    | Alle unspezifisch Matrix  | Negativ                         |
| II.  | RMS    | Intensität +, Fläche 1-25 % diffus 2 von 5, im Zytoplasma, alle unspezifisch Matrix                               | SP im ZP 2 von 5<br>NEG 3 von 5 |
| III. | LS     | Intensität und Fläche + 50-75 % 1 von 5 , + 1-25 % 1 von 5, beide diffus, im Zytoplasma, alle unspezifisch Matrix | SP im ZP 2 von 5<br>NEG 3 von 5 |
| IV.  | Gefäße | Intensität der Gefäße + im LMS 2 von 2 und im RMS 2 von 3, + - ++ im LS 5 von 5, 4 NB                             | POS 9 von 15<br>NEG 6 von 15    |

Die Färbungen am Leiomyosarkom sind als negativ anzusehen, nur die Matrix wurde unspezifisch angefärbt. Beim Rhabdomyosarkom wurde in zwei Fällen das Zytoplasma mit einer schwachen Intensität positiv diffus verteilt angefärbt. Der prozentuale Anteil der angefärbten Tumorfläche beläuft sich auf 1-25 %. Ebenso haben beim RMS drei Fälle keine spezifische Färbung ergeben, nur die Matrix wurde unspezifisch angefärbt. Die Auswertung der Liposarkome ergab bei zwei Fällen spezifisch angefärbtes Zytoplasma. Die gefärbten Tumorzellen verteilen sich diffus über eine Tumorfläche von je 1-25 % und 50-75 %. In allen fünf Fällen konnte eine unspezifische Färbung der Matrix festgestellt werden. Bei drei Liposarkomen konnte keine Antikörperbindung im Zytoplasma nachgewiesen werden. Die Gefäßfärbung zeigt kein eindeutiges Bild, neun von 15 Gewebeschnitte sind positiv mit einer Intensität zwischen schwach und mittel. Die weiteren Gewebeschnitte fielen negativ aus oder waren nicht beurteilbar.



Fotos der IHC-Färbungen auf Sarkomen

Resümee AK W3C4-CD349

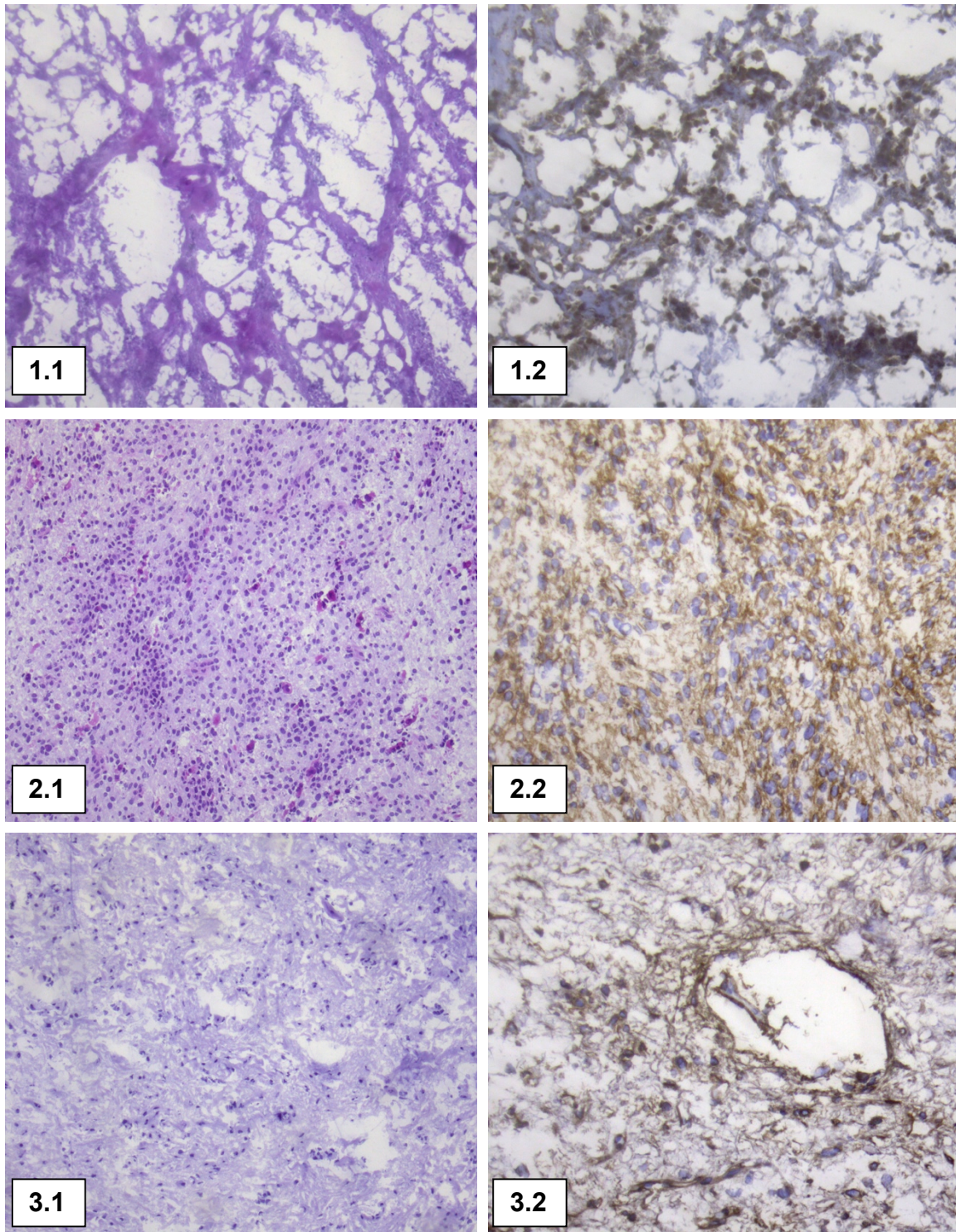


Abbildung 12 Fotos in Spalten: links H.E.-Färbung, rechts IHC-Färbung mit AK W3C4

- 1) Reihe Leiomyosarkom, Patient 2, 1.1 und 1.2 x200 Originalvergrößerung
- 2) Reihe Rhabdomyosarkom, Patient 9, 2.1 x100 und 2.2 x200 Originalvergrößerung
- 3) Reihe Liposarkom, Patient 12, 3.1 x100 und 3.2 x200 Originalvergrößerung

Bewertung der IHC-Färbung auf Multi tissue

Resümee AK W3C4-CD349

|      | Multi Tissue      | Intensität und Fläche  | Kurzes Fazit |
|------|-------------------|--|--------------|
| I.   | Haut              | <ul style="list-style-type: none"> <li>• 100 % ++ Basalmembran, Hautanhangsgebilde</li> <li>• +++ Gefäße: Endothel</li> <li>• + /++ Faseranteile von Kollagen</li> </ul> | Positiv      |
| II.  | Glatte Muskulatur | <ul style="list-style-type: none"> <li>• ++ Muskulatur positiv</li> <li>• +++ Gefäße: Endothel</li> </ul>  | Positiv      |
| III. | Fett              | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Fett inhomogen positiv</li> <li>• ++ Gefäße</li> </ul>  | Positiv      |
| IV.  | Mamma Karzinom    | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Mamma Karzinom negativ</li> <li>• ++/+++ desmopl. Stroma</li> <li>• + Gefäße</li> <li>• ++ BG- u. Kollagenfasern</li> </ul>     | Positiv      |

In der Haut ist die Basalmembran mit ihren Hautanhangsgebilden positiv mit einer mittleren Intensität bis zu 100 % angefärbt. Im Kollagen waren Faseranteile mit einer Intensität von schwach bis mittel gefärbt. Eine starke Gefäßfärbung gab es in Haut, glatter Muskulatur und Fettgewebe. Im Mamma-Karzinom fiel die Gefäßfärbung schwach aus. In der Haut und in der gl. Muskulatur war eine Endothelfärbung zu erkennen. Die glatte Muskulatur war mit mittlerer Intensität positiv angefärbt. Das Fettgewebe ist inhomogen positiv gefärbt. Das Mamma-Karzinom ist negativ, aber das desmoplastische Stroma ist positiv bei mittlerer bis starker Intensität. Die Bindegewebsfasern und Kollagenfasern sind positiv.



Fotos der IHC-Färbung auf Multi tissue

Resümee AK W3C4-CD349

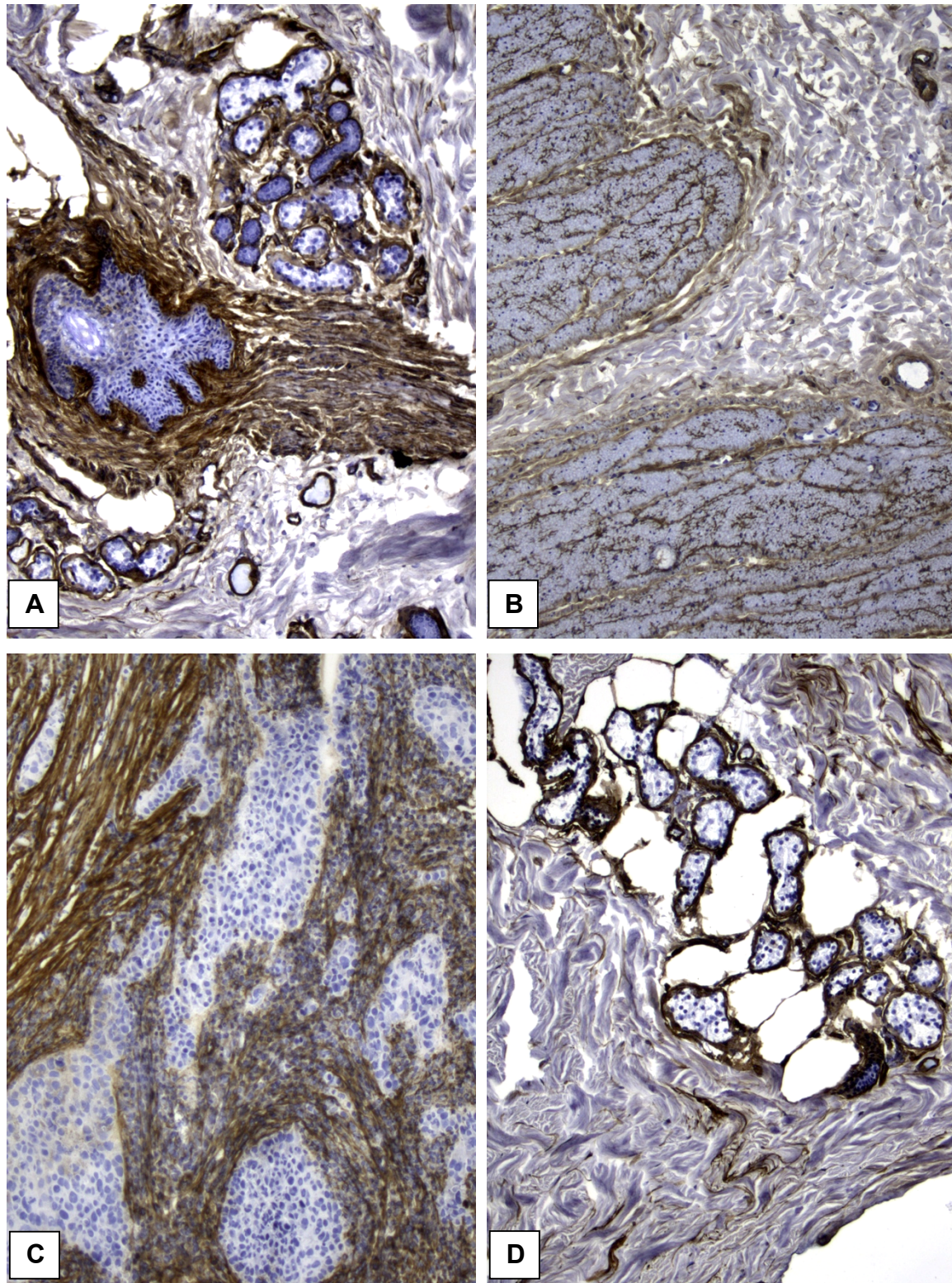


Abbildung 13 Multi tissue, IHC-Färbung mit AK W3C4, Originalvergrößerung:

A) Haut x40, B) glatte Muskulatur x 40, C) Mamma CA x100, D) Fett x40

Zusammenschau

## Resümee AK W3C4-CD349

|      | <b>Gewebe-<br/>Typen</b> | <b>Immunhistochemie</b>                           | <b>FACS</b> |
|------|--------------------------|---|-------------|
| I.   | LMS                      | Negativ<br>alle LMS-Schnitten                     | 76.7 %      |
| II.  | RMS                      | Spezifisch im Zytoplasma<br>2 von 5 RMS-Schnitten | 90.1 %      |
| III. | LS                       | Spezifisch im Zytoplasma<br>2 von 5 LS-Schnitten  | 99.3 %      |

In der IHC erbrachten die Anfärbungen des AK W3C4-CD349 eine unspezifische Matrixfärbung der Leiomyosarkome und waren negativ für das Zytoplasma. Erstaunlicherweise zeigt sich in der FACS-Analyse für das LMS für W3C4-CD349 ein positiver Wert von fast 77 %. Das Zytoplasma der Rhabdomyosarkome ist in zwei Fällen der IHC mit geringer Intensität und maximaler diffuser Flächenabdeckung von 25 % positiv bewertet. Alle weiteren Anfärbungen auf den RMS wurden als unspezifische Färbungen der Matrix interpretiert. Die Durchflusszytometrie für das RMS ergibt eine positive Zelldetektion von ca. 90 % für den AK W3C4-CD349. In der Immunhistochemie sind zwei Proben der Liposarkome mit einer geringen Intensität und mittleren Fläche mit AK W3C4-CD349 gefärbt. In der FACS-Analyse stachen fast 100 % positive Bindungen zwischen LS und dem Antikörper W3C4-CD349 hervor, ebenso die mesenchymalen Stammzellen mit einer Färbung des AK W3C4-CD349 von fast 90 %. Die Vorhautfibroblasten sind zu fast 65 % positiv. Zusammenfassend wird W3C4 als zu wenig sarkomspezifischer Antikörper bewertet.

## Auswertung der FACS-Daten von Sarkomen

## Resümee AK W3C4-CD349

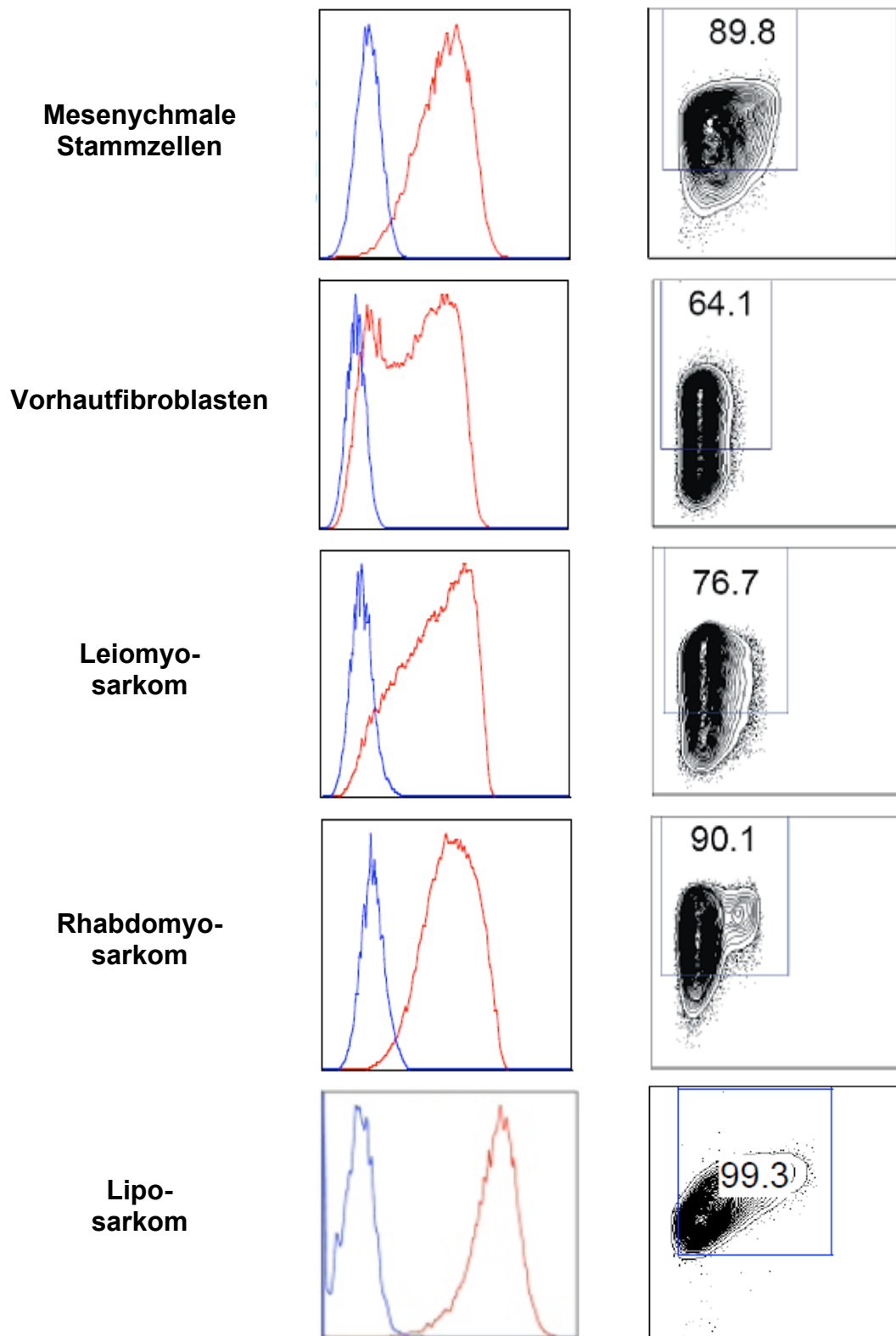


Abbildung 14 AK W3C4, mit der Durchflusszytometrie erhobene Daten; links von oben, Zelltyp: mesenchymale Stammzellen, Vorhautfibroblasten, LMS, RMS, LS; mittig Histogramme und rechts Dot Plots mit Angabe der Marker positiven Zellen in Prozent (1)



### 3.4.5 V. Antikörper W7C5F8-CD109

#### Bewertung der IHC-Färbung auf Sarkomen

|      | Typen  | Intensität, Fläche, Verteilungsart   | Kurzes Fazit                    |
|------|--------|--|---------------------------------|
| I.   | LMS    | Intensität + - ++, Fläche 25-50 % diffus<br>2 von 4, im Zytoplasma, 1 von 1 USP Matrix                                     | SP im ZP 2 von 4<br>NEG 2 von 4 |
| II.  | RMS    | Intensität +++, Fläche 50-75 % diffus<br>1 von 5, im Zytoplasma,<br>3 von 5 unspezifisch Matrix                            | SP im ZP 1 von 5<br>NEG 4 von 5 |
| III. | LS     | Intensität und Fläche ++ 25-50 % 1 von 5,<br>++ 1-25 % 1 von 5 beide diffus,<br>im Zytoplasma, 1 von 1 unspezifisch Matrix | SP im ZP 2 von 5<br>NEG 3 von 5 |
| IV.  | Gefäße | Intensität ++ 9 von 14, +++ 5 von 15, neg. 1<br>von 15   | POS 14 von 15<br>NEG 1 von 15   |

Die Tumorzellen des Leiomyosarkoms wurden im Zytoplasma spezifisch angefärbt. Es präsentierte sich ein einheitliches Färbemuster mit einer schwachen bis mittleren Intensität sowie einer diffusen Verteilung auf eine Tumورfläche von 25-50 % bei zwei Fällen. Die anderen Leiomyosarkome waren negativ, abgesehen von einer unspezifischen Färbung der Matrix. Die Bewertung der Rhabdomyosarkome ergab nur eine spezifische Färbung. Hier waren die zytoplasmatisch angefärbten Tumorzellen diffus über eine Tumорfläche von 50-75 % verteilt. Die anderen Rhabdomyosarkome waren negativ, bei insgesamt drei Rhabdomyosarkomen wurde eine unspezifische Reaktion in der Matrix nachgewiesen. Das Zytoplasma wurde in zwei Liposarkomen spezifisch mit einer mittleren Intensität angefärbt. Diese Tumorzellen verteilen sich diffus über eine Tumорfläche von je 1-25 und 25-50 %. Einmal wurde die Matrix unspezifisch gefärbt, alle weiteren Färbungen des Liposarkoms waren negativ. Die Gefäße waren in 14 von 15 Fällen mit einer mittleren bis starken Intensität angefärbt.

Fotos der IHC-Färbungen auf Sarkomen

Resümee AK W7C5F8-CD109

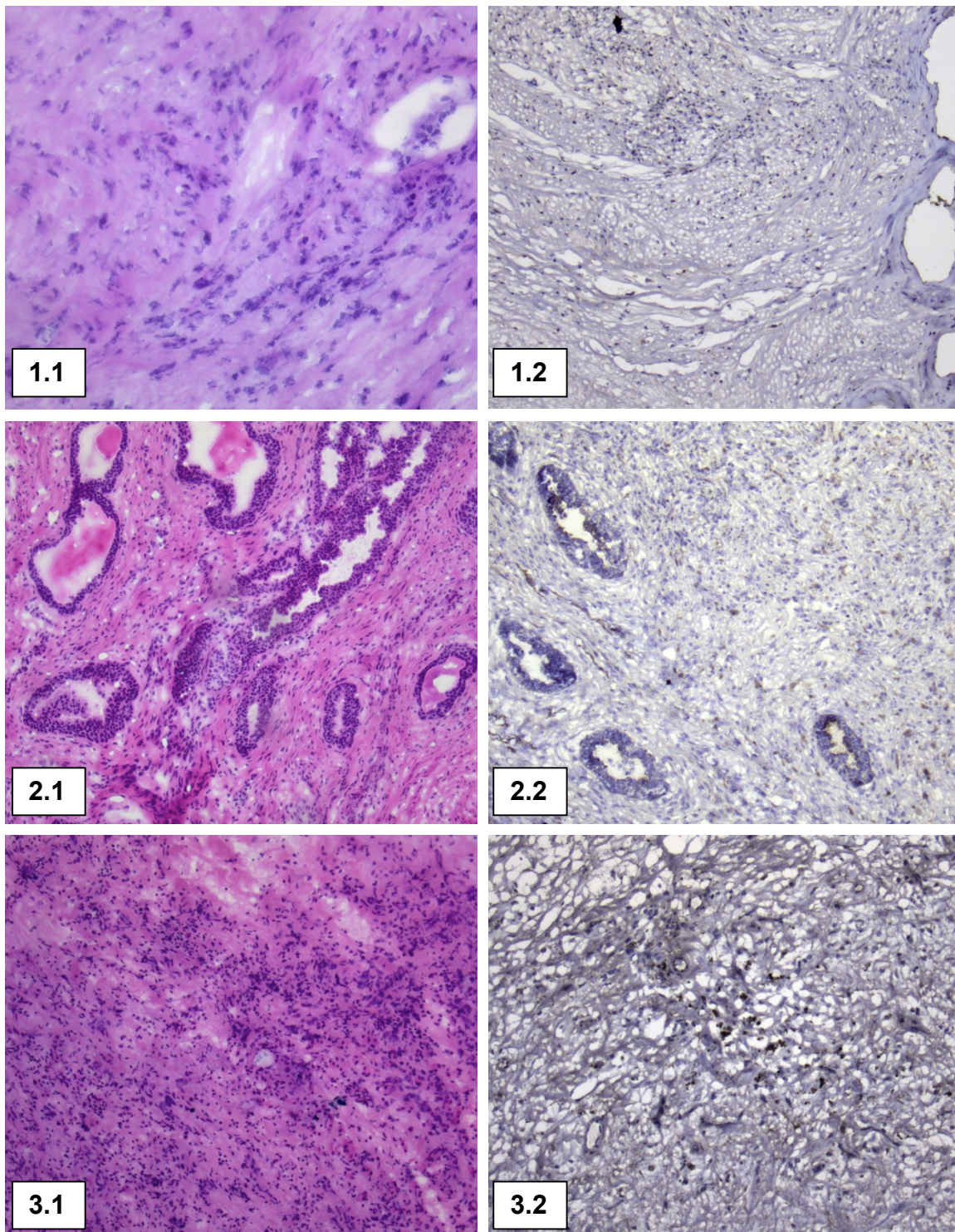


Abbildung 15 Fotos in Spalten: links H.E.-Färbung, rechts IHC-Färbung mit AK W7C5F8

1) Reihe Leiomyosarkom, Patient 3, 1.1 x200 und 1.2 x100 Originalvergrößerung

2) Reihe Rhabdomyosarkom, Patient 8, 2.1 und 2.2 x100 Originalvergrößerung

3) Reihe Liposarkom, Patient 12, 3.1 und 3.2 x100 Originalvergrößerung

Bewertung der IHC-Färbung auf Multi tissue*Resümee AK W7C5F8-CD109*

|      | <b>Multi Tissue</b> | <b>Intensität und Fläche</b>  | <b>Kurzes Fazit</b> |
|------|---------------------|---|---------------------|
| I.   | Haut                | <ul style="list-style-type: none"> <li>+ positiv membranständiges Epithel Hautanhangsgebilde/ Haarbalg</li> </ul> | Positiv             |
| II.  | Glatte Muskulatur   | <ul style="list-style-type: none"> <li>Glatte Muskulatur negativ</li> </ul>                                       | Negativ             |
| III. | Fett                | <ul style="list-style-type: none"> <li>Fett negativ</li> </ul>  | Negativ             |
| IV.  | Mamma Karzinom      | <ul style="list-style-type: none"> <li>Mamma Karzinom negativ</li> <li>+++ Desmoplastisches Stroma</li> </ul>     | Negativ             |

In der Betrachtung der Haut präsentierte sich membranständiges Epithel der Hautanhangsgebilde und Haarbalge mit einer schwachen Färbung positiv. In der Auswertung der glatten Muskulatur konnte keine positive Färbung gefunden werden. Ebenso ergab die Beurteilung des Fettgewebes nur negative Ergebnisse. Letztendlich konnte auch keine positive Reaktion in den Tumorzellen des Mamma-Karzinoms gefunden werden. Jedoch zeigte sich eine starke Färbereaktion am desmoplastischen Stroma.



Fotos der IHC-Färbung auf Multi tissue

Resümee AK W7C5F8-CD109

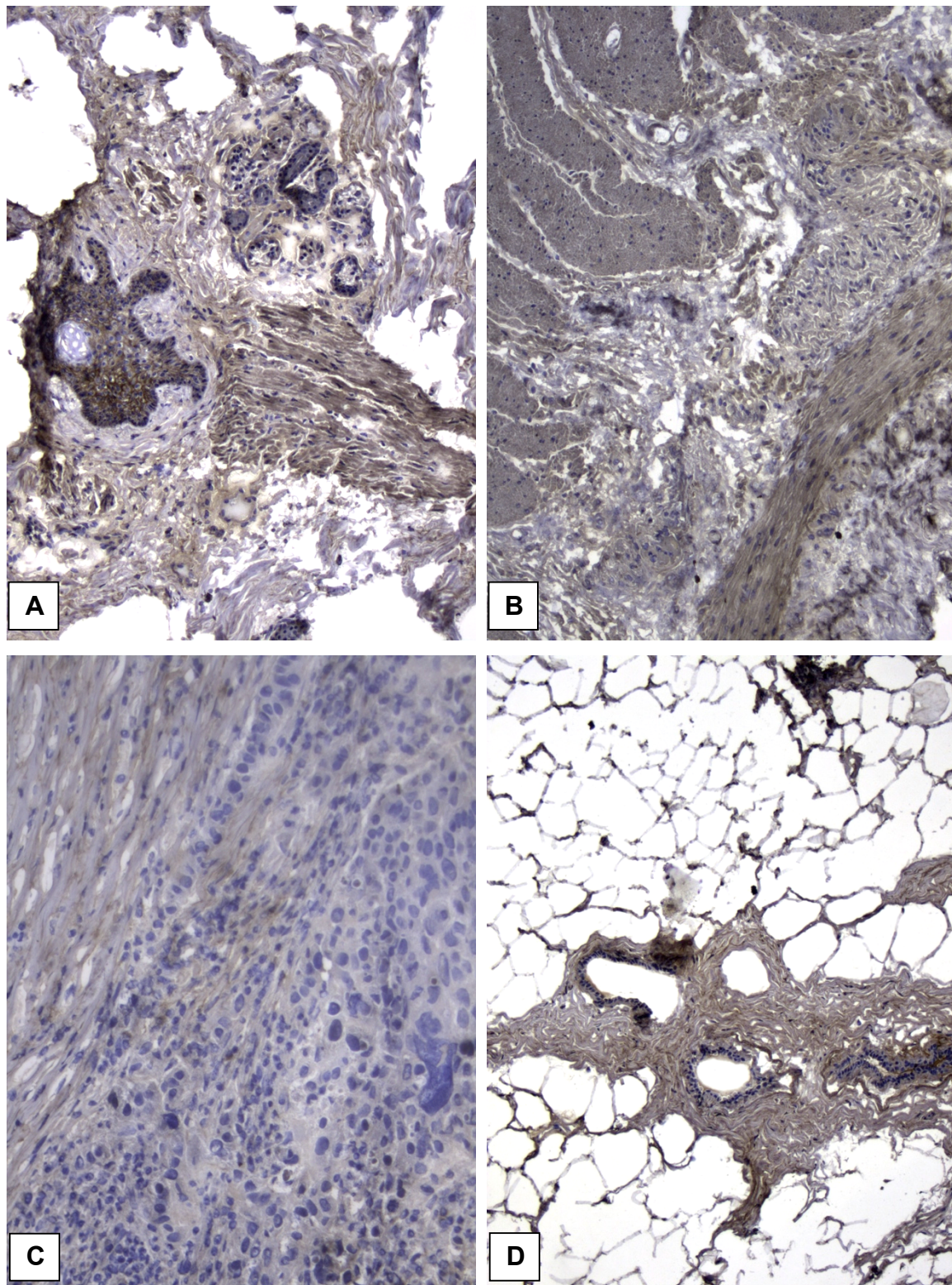


Abbildung 16 Multi tissue, IHC-Färbung mit AK W7C5F8, Originalvergrößerung:

A) Haut x40, B) glatte Muskulatur x40, C) Mamma CA x100, D) Fett x40

Zusammenschau*Resümee AK W7C5F8-CD109*

|      | <b>Gewebe-<br/>Typen</b> | <b>Immunhistochemie</b>                           | <b>FACS</b> |
|------|--------------------------|---|-------------|
| I.   | LMS                      | Spezifisch im Zytoplasma<br>2 von 4 LMS-Schnitten | 10 %        |
| II.  | RMS                      | Spezifisch im Zytoplasma<br>4 von 5 RMS-Schnitten | 64 %        |
| III. | LS                       | Spezifisch im Zytoplasma<br>2 von 5 LS-Schnitten  | 84 %        |

In der IHC zeigt sich eine spezifische Zytoplasmafärbung des AK W7C5F8-CD109 bei den Leiomyosarkomen in 2 Fällen mit einer geringen bis mittleren Intensität, sowie einer diffusen Flächenverteilung von 25-50 %. In der Durchflusszytometrie bindet der Antikörper W7C5F8-CD109 zu 10 % auf dem LMS. Mit einer starken Intensität und einer diffusen Fläche von 50-75 % wurde das Rhabdomyosarkom spezifisch mit dem AK W7C5F8-CD109 gefärbt. Die Durchflusszytometrie ergibt 64 % positive Zellen für AK W7C5F8-CD109 auf dem RMS. Im LS ist in zwei Proben bei der IHC eine diffuse spezifische Anfärbung des Zytoplasmas von mittlerer Intensität bei einer Fläche von 1-50 % mit AK W7C5F8-CD109 zu beobachten. Die FACS-Analyse zeigt für das Liposarkom 84 % positive Zellen für den AK W7C5F8-CD109. Eine stark positive Färbung ergab sich für die mesenchymalen Zellen mit 85 % und bei den Vorhautfibroblasten mit 88 %. Die eindruckliche Varianz der IHCs und FACS-Analysen lässt sich am ehesten durch die unterschiedlichen Probestücke der Sarkome bzw. der individuellen Expression der Antigene erklären. Insgesamt lässt sich für diesen Antikörper eine sarkomspezifische Färbung der Gefäße erkennen. Auch die teils sehr starke Zytoplasma-Färbung bei einzelnen Sarkomen macht ihn für weitere Untersuchungen im Hinblick auf Proliferation des Sarkoms und Progression der Erkrankung interessant.



## Auswertung der FACS-Daten von Sarkomen

## Resümee AK W7C5F8-CD109

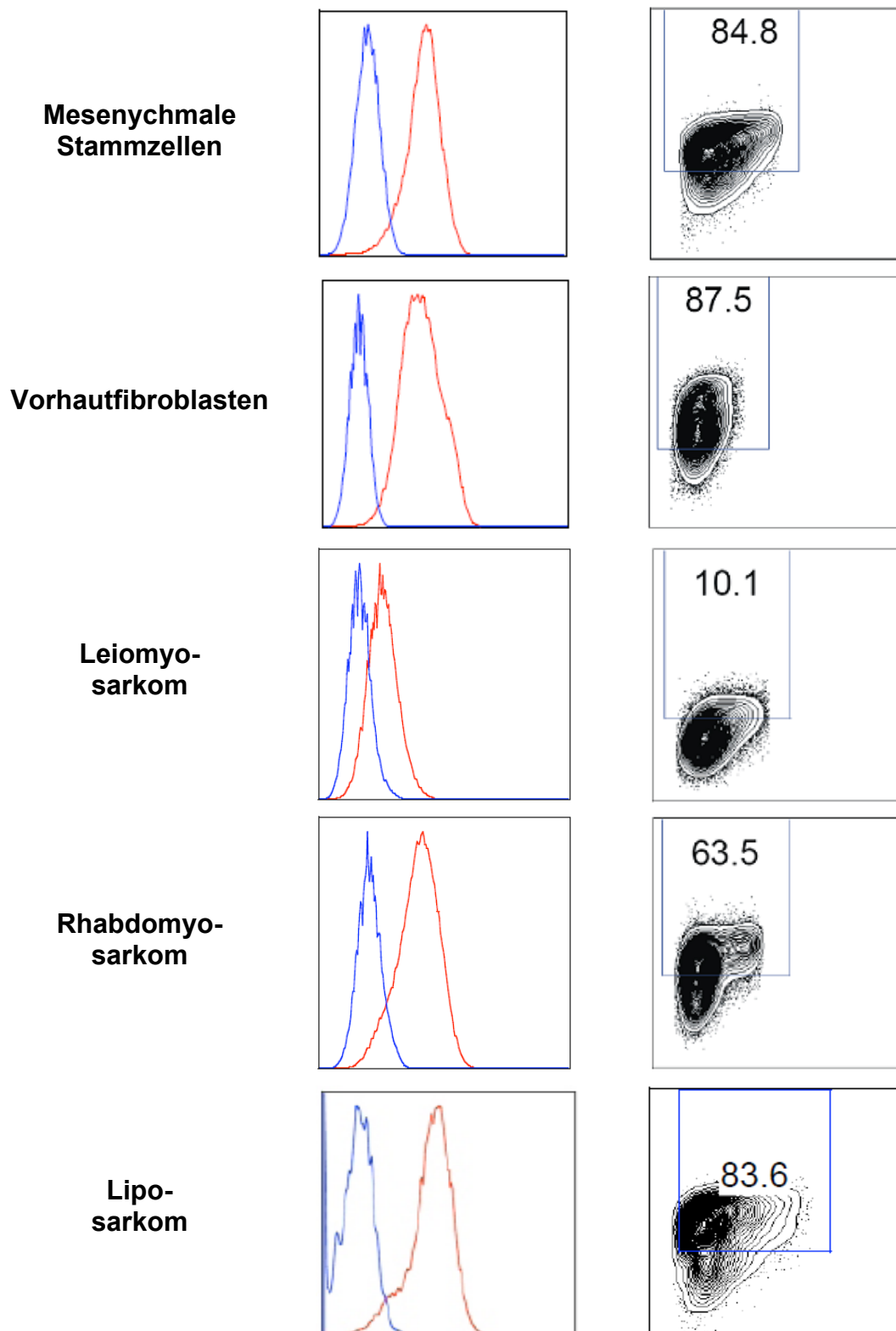


Abbildung 17 AK W7C5F8, mit der Durchflusszytometrie erhobene Daten; links von oben, Zelltyp: mesenchymale Stammzellen, Vorhautfibroblasten, LMS, RMS, LS; mittig Histogramme und rechts Dot Plots mit Angabe der Marker positiven Zellen in Prozent (1)

### 3.4.6 VI. Antikörper W5C5

#### Bewertung der IHC-Färbung auf Sarkomen

|      | Typen  | Intensität, Fläche, Verteilungsart  | Kurzes Fazit            |
|------|--------|---|-------------------------|
| I.   | LMS:   | Intensität ++, Fläche 50-75 % vereinzelt<br>1 von 4, im Zytoplasma,<br>alle unspezifisch Matrix                                       | SP im ZP 1/4<br>NEG 3/4 |
| II.  | RMS    | Intensität ++, Fläche 50-75 % diffus 1 von 5,<br>im Zytoplasma, alle unspezifisch Matrix,<br>bei Patient 10 glatte Muskulatur positiv | SP im ZP 1/5<br>NEG 4/5 |
| III. | LS     | Intensität und Fläche ++ 1-25 % und ++ 50-<br>75 % je 1 Patient, beide diffus,<br>im ZP 2 von 5, alle unspezifisch Matrix             | SP im ZP 2/5<br>NEG 3/5 |
| IV.  | Gefäße | Intensität + 2 von 15, ++ - +++ 12 von 15,<br>negativ 1 von 15  | POS 14/15<br>NEG 1/15   |

Bei den Leiomyosarkomen gab es nur eine spezifische Färbung des Zytoplasmas. Diese Tumorzellen verteilten sich vereinzelt bei mittlerer Intensität und bedeckten eine Tumorfläche von 50-75 %. Bei allen vier Leiomyosarkomen war eine unspezifische Färbung der Matrix zu erkennen. Die Rhabdomyosarkome zeigen nur in einem Fall eine spezifische Färbung des Zytoplasmas. Diese stellt sich mit einer diffusen Verteilung bei einer mittleren Intensität auf einer Tumorfläche von 50-75 % dar. Alle fünf Rhabdomyosarkome weisen eine unspezifische Färbung in der Matrix auf und bei einem RMS ist die Muskulatur positiv. In allen fünf Liposarkomen konnten unspezifische Färbungen in der Matrix festgestellt werden. Bei zwei Liposarkomen war eine spezifische Zytoplasmafärbung mit einer mittleren bis starken Intensität in den Tumorzellen zu sehen. Diese war diffus über eine angefärbte Tumorfläche von je 1-25 und 50-75 % verteilt. Die Intensität der Gefäßfärbung war in 2 von 15 Fällen schwach und bei 12 von 15 Fällen mittel bis stark.

## Fotos der IHC-Färbungen auf Sarkomen

## Resümee AK W5C5

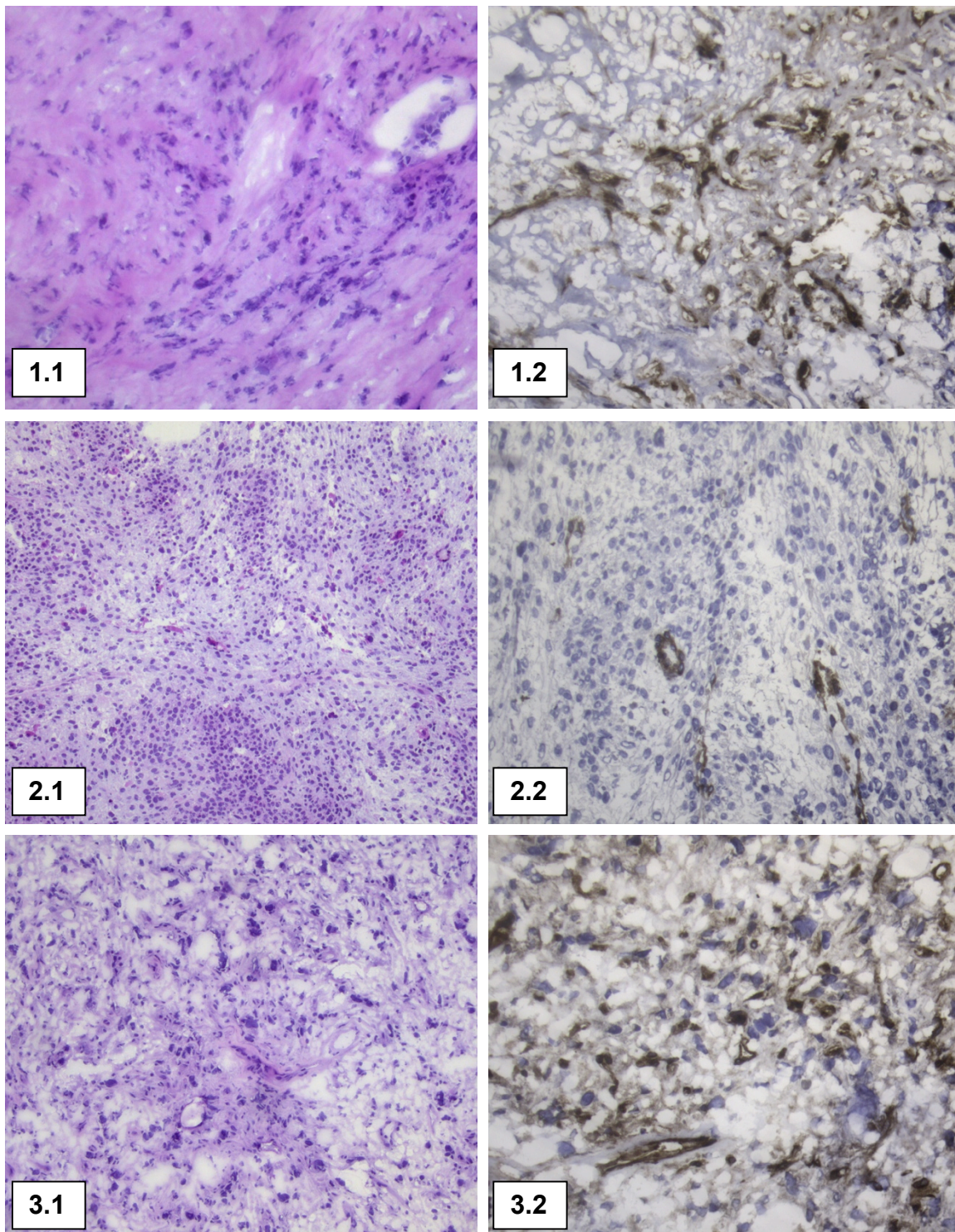


Abbildung 18 Fotos in Spalten: links H.E.-Färbung, rechts IHC-Färbung mit AK W5C5

- 1) Reihe Leiomyosarkom, Patient 2, 1.1 und 1.2 x200 Originalvergrößerung
- 2) Reihe Rhabdomyosarkom, Patient 9, 2.1 x100 und 2.2 x200 Originalvergrößerung
- 3) Reihe Liposarkom, Patient 11, 3.1 x10 und 3.2 x200 Originalvergrößerung

## Bewertung der IHC-Färbung auf Multi tissue

Resümee AK W5C5

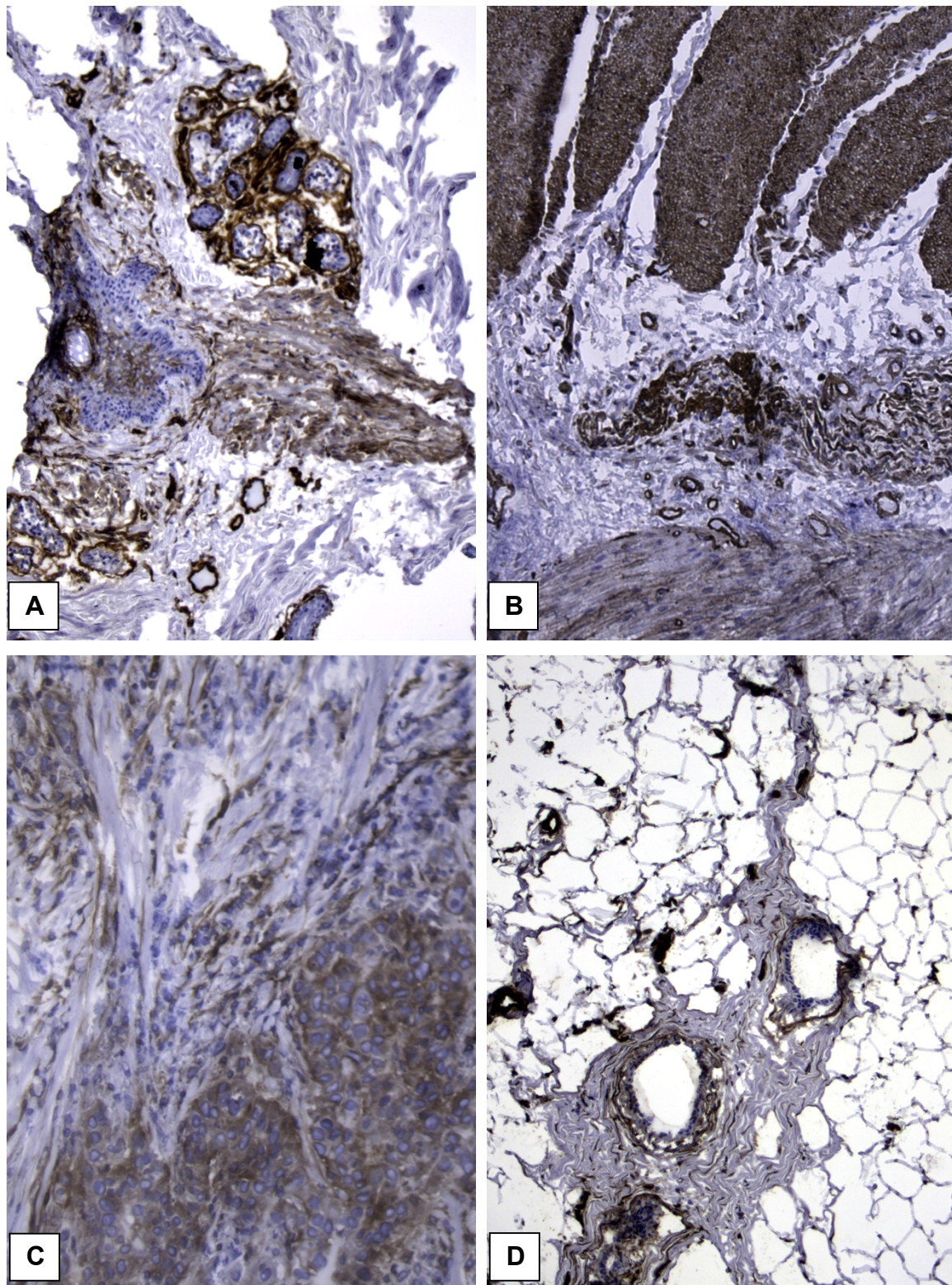
|      | <b>Multi Tissue</b> | <b>Bewertung</b><br><b>Intensität und Fläche</b>   | <b>Kurzes</b><br><b>Fazit</b> |
|------|---------------------|--|-------------------------------|
| I.   | Haut                | <ul style="list-style-type: none"> <li>• ++ Myoepithel der Hautanhangsgebilde</li> <li>• ++ Gefäße</li> </ul>                      | Positiv                       |
| II.  | Glatte Muskulatur   | <ul style="list-style-type: none"> <li>• ++ Glatte Muskulatur positiv</li> <li>• ++ Gefäße</li> </ul>                              | Positiv                       |
| III. | Fett                | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Fett negativ</li> <li>• ++ Gefäße</li> </ul>  | Negativ                       |
| IV.  | Mamma Karzinom      | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Mamma Karzinom negativ</li> <li>• Desmoplastisches Stroma</li> <li>• ++ Gefäße</li> </ul> | Negativ                       |

In der Betrachtung der Haut konnte eine positive Antikörperreaktion von mittlerer Intensität im Myoepithel der Hautanhangsgebilde entdeckt werden. Die glatte Muskulatur präsentiert sich hier mit einer mittleren Intensität positiv. In der Auswertung war keine Färbung des Fettgewebes erkennbar. In der Beurteilung des Mamma-Karzinoms zeigten sich keine positiven Tumorzellen. Jedoch konnte man eine positive Färbereaktion im desmoplastischen Stroma erkennen. In allen Gewebearten Haut, glatte Muskulatur, Fett und Mamma-Karzinom war ein einheitliches Färbemuster der Gefäße mit einer mittleren Intensität erkennbar.



Fotos der IHC-Färbung auf Multi tissue

*Resümee AK W5C5*



**Abbildung 19 Multi tissue, IHC-Färbung mit AK W5C5, Originalvergrößerung:**

**A) Haut x40, B) glatte Muskulatur x40, C) Mamma CA x100, D) Fett x40**

Zusammenschau*Resümee AK W5C5*

|      | <b>Gewebe-<br/>Typen</b> | <b>Immunhistochemie</b>                           | <b>FACS</b> |
|------|--------------------------|---|-------------|
| I.   | LMS                      | Spezifisch im Zytoplasma<br>1 von 4 LMS-Schnitten | 0 %         |
| II.  | RMS                      | Spezifisch im Zytoplasma<br>1 von 5 RMS-Schnitten | 5 %         |
| III. | LS                       | Spezifisch im Zytoplasma<br>2 von 5 LS-Schnitten  | 14 %        |

In der IHC mit dem AK W5C5 sind im Leiomyosarkom in allen vier Fällen unspezifische Färbungen der Matrix zu verzeichnen, lediglich eine Probe zeigt eine spezifische Zytoplasmafärbung mit mittlerer Intensität bei vereinzelter Verteilung und auf einer Fläche von 50-75 %. In der FACS-Analyse zeigt sich im LMS und RMS keine oder nur eine schwach positive Färbung von 5 % mit dem Antikörper W5C5. In der IHC mit W5C5 war bei den Rhabdomyosarkomen ein Fall mit einer mittleren Intensität positiv, diffus auf 50-70 % der Tumorfläche verteilt. Alle anderen Proben waren unspezifisch positiv für die Matrix und negativ im Zytoplasma. Das LS war in der IHC für W5C5 in zwei Proben positiv im Zytoplasma spezifisch diffus angefärbt mit einer mittleren Intensität bei einer Flächenverteilung von 1-75 %. In der Durchflusszytometrie zeigten sich die mesenchymalen Stammzellen mit ca. 28 % und die Vorhautfibroblasten mit 15 % positiv. Aufgrund der unspezifischen Matrixfärbungen in der IHC und der insgesamt sehr stark variierenden Färbungen ist dieser Antikörper als Marker bei den hier vorliegenden Ergebnissen uninteressant.

## Auswertung der FACS-Daten von Sarkomen

## Resümee AK W5C5

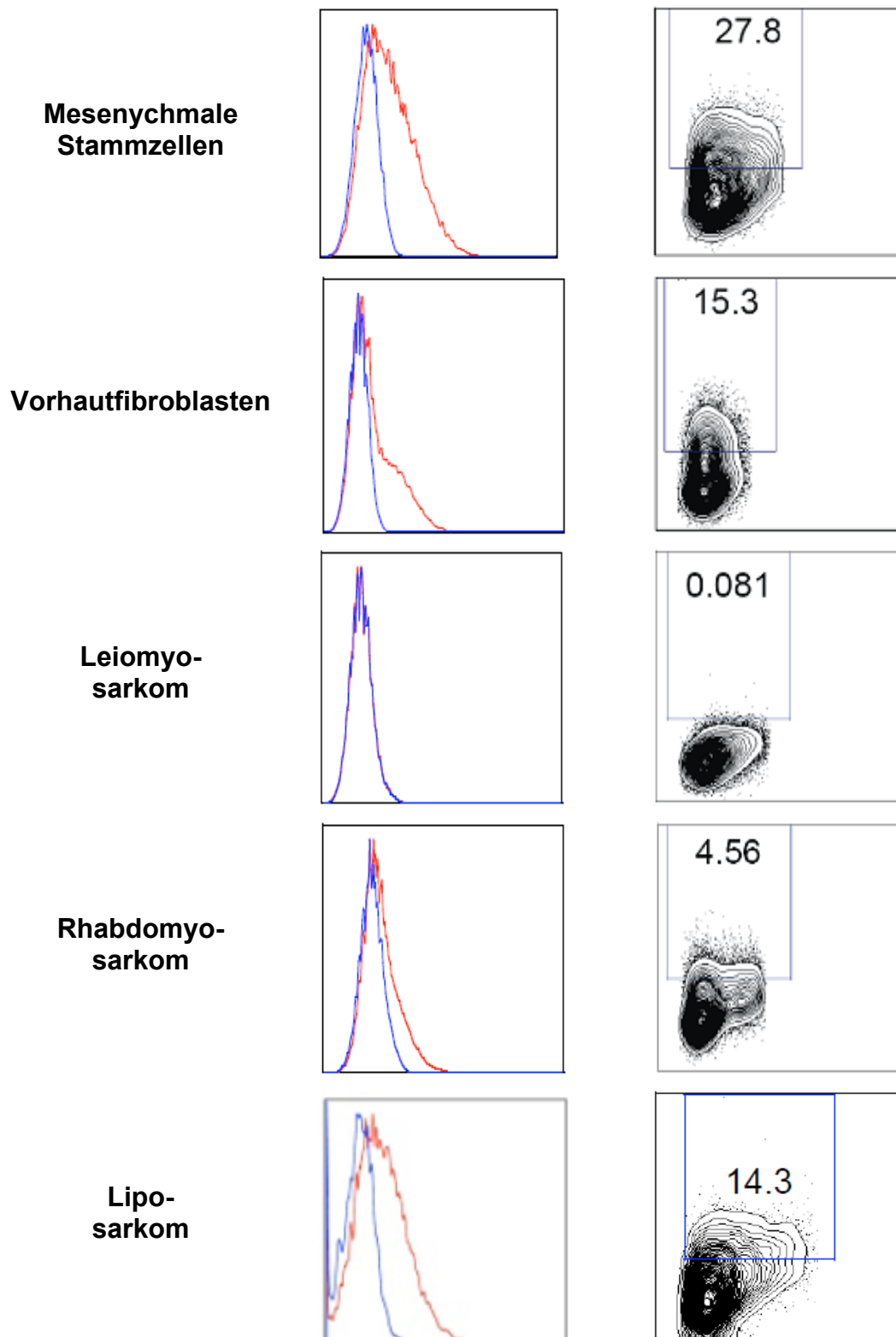


Abbildung 20 AK W5C5, mit der Durchflusszytometrie erhobene Daten; links von oben, Zelltyp: mesenchymale Stammzellen, Vorhautfibroblasten, LMS, RMS, LS; mittig Histogramme und rechts Dot Plots mit Angabe der Marker positiven Zellen in Prozent (1)

### 3.4.7 VII. Antikörper W3D5A9

#### Bewertung der IHC-Färbung auf Sarkomen

|      | Typen  | Intensität, Fläche, Verteilungsart   | Kurzes Fazit                    |
|------|--------|--|---------------------------------|
| I.   | LMS    | Intensität und Fläche ++ 75-100 % 1 von 4, +++ 50-75 %, beide diffus und +++1-25 % vereinzelt, im ZP, alle unspezifisch Matrix | SP im ZP 3 von 4<br>NEG 1 von 4 |
| II.  | RMS    | Intensität und Fläche ++ - +++ 50-75 % 3 von 5, ++ - +++ 1-50 % 2 von 5, alle vereinzelt-diffus, im ZP, 3 von 5 USP Matrix     | SP im ZP 5 von 5                |
| III. | LS     | Intensität und Fläche +++ 50-75 % diffus-homogen 2 von 5, ++ 1-50 % vereinzelt-diffus, im ZP, 2 von 5 unspezifisch Matrix      | SP im ZP 4 von 5<br>NEG 1 von 5 |
| IV.  | Gefäße | Intensität +++ 5 von 15 und ++ 10 von 15   | POS 15 von 15                   |

Drei der vier der Leiomyosarkome sind spezifisch im Zytoplasma der Tumorzellen gefärbt. Dies zeigt sich bei einer mittleren bis starken Intensität sowie diffuser und homogener Verteilung. Die prozentual angefärbte Tumorfläche variiert von 1-25 %, 50-75 % bis zu 75-100 %. Ein Fall enthält keine spezifische Färbung, zwei Fälle der im Zytoplasma spezifisch gefärbten LMS weisen zudem eine unspezifische Matrixfärbung auf. Alle Rhabdomyosarkome sind spezifisch im Zytoplasma der Tumorzellen mit mittlerer bis starker Intensität und einer Verteilung von diffus bis zu homogen angefärbt. Die angefärbte Tumorfläche der RMS beträgt in drei von fünf Fällen 50-75 %, in einem 25-50 % und beim letzten 1-25 %. Vier Liposarkome hatten eine spezifische Färbung im Zytoplasma mit einer Intensität von schwach und stark. Die prozentual angefärbte Tumorfläche beträgt in zwei Fällen 50-75 %, einem Fall 25-50 % und einem weiteren 1-25 %. Die Verteilung der spezifischen Färbung ist vereinzelt, diffus und homogen. Ein Liposarkom zeigt keine spezifische Färbung. Die Gefäße sind positiv mit einer Intensität von mittel bis stark gefärbt.



## Fotos der IHC-Färbungen auf Sarkomen

## Resümee AK W3D5A9

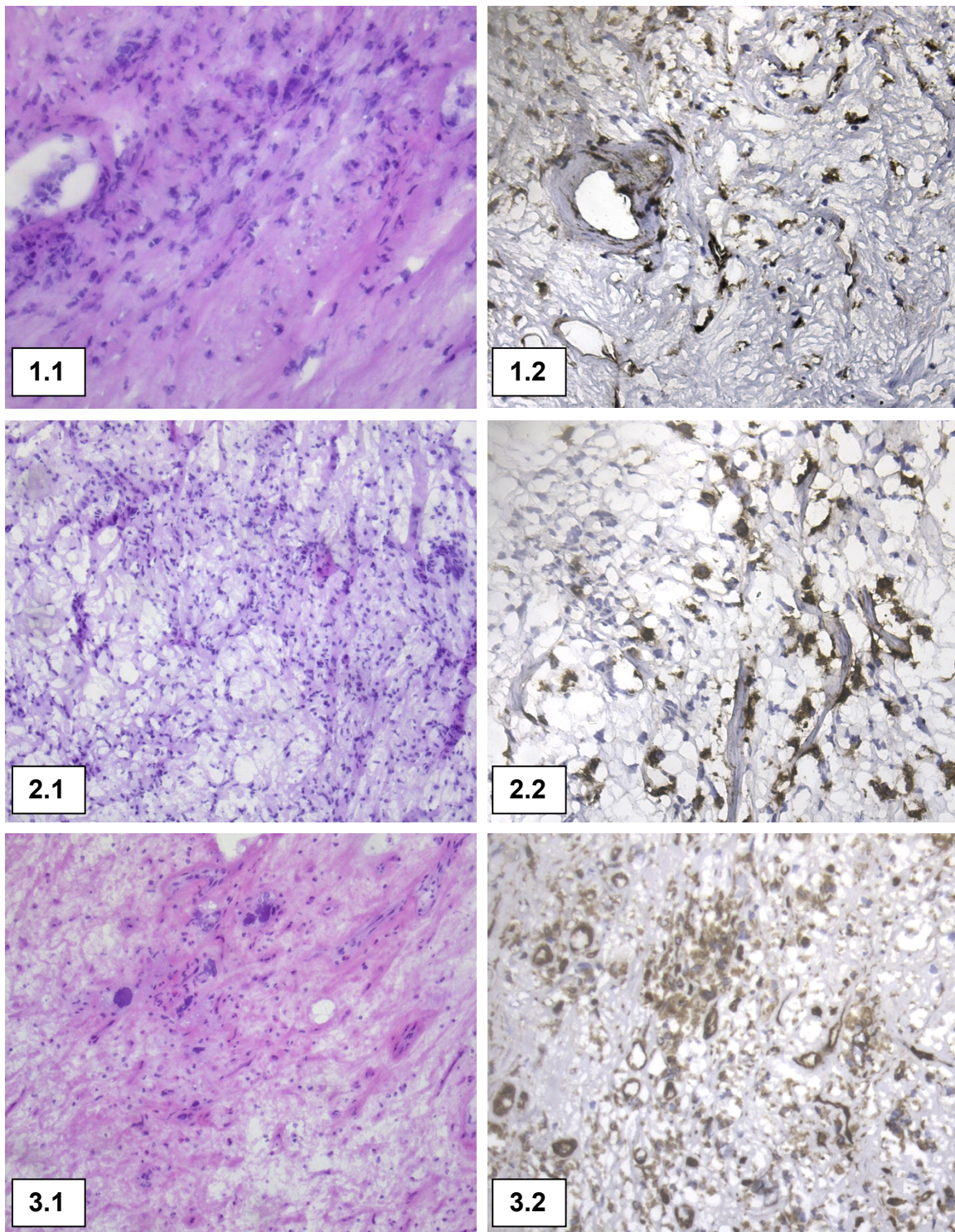


Abbildung 21 Fotos in Spalten: links H.E.-Färbung, rechts IHC-Färbung mit AK W3D5A9

- 1) Reihe Leiomyosarkom, Patient 3, 1.1 und 1.2 x200 Originalvergrößerung
- 2) Reihe Rhabdomyosarkom, Patient 6, 2.1 x100 und 2.2 x200 Originalvergrößerung
- 3) Reihe Liposarkom, Patient 14, 3.1 x100 und 3.2 x100 Originalvergrößerung

Bewertung der IHC-Färbung auf Multi tissue*Resümee AK W3D5A9*

|      | <b>Multi Tissue</b> | <b>Bewertung</b><br><b>Intensität und Fläche</b>   | <b>Kurzes</b><br><b>Fazit</b> |
|------|---------------------|--|-------------------------------|
| I.   | Haut                | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Haut negativ</li> <li>• +++ Gefäße/ Myoepithel</li> </ul>   | Negativ                       |
| II.  | Glatte Muskulatur   | <ul style="list-style-type: none"> <li>• ++ Glatte Muskulatur positiv</li> <li>• ++ Gefäße</li> <li>• ++ Nerven</li> </ul>   | Positiv                       |
| III. | Fett                | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Fett negativ</li> <li>• ++ Gefäße</li> <li>• ++ BG-Fasern</li> </ul>  | Negativ                       |
| IV.  | Mamma Karzinom      | <ul style="list-style-type: none"> <li>• ++ homogen Mamma</li> <li>• Karzinom positiv</li> <li>• + desmoplastisches Stroma</li> <li>• ++ Gefäße</li> <li>• ++ BG-Fasern</li> </ul> | Positiv                       |

Die Haut selbst präsentiert sich bei diesem Antikörper negativ. In der Betrachtung der glatten Muskulatur erkennt man eine spezifische positive Färbung mit einer mittleren Intensität. Ebenso sind in diesem Gewebeabschnitt die Nerven mit mittlerer Intensität gefärbt. In der Auswertung stellt sich das Fettgewebe negativ dar. Bei der Beurteilung des Mamma-Karzinoms können homogen verteilte Tumorzellen entdeckt werden. Diese sind spezifisch mit einer mittleren Intensität angefärbt. Auch das desmoplastische Stroma wird leicht angefärbt. Ebenso findet man in diesem Abschnitt des Multi tissue auch positiv markiertes Bindegewebe mit mittlerer Intensität. In allen vier Gewebestücken sind die Gefäße positiv mit einer mittleren Intensität angefärbt. In der Haut lässt zusätzlich zur Gefäßfärbung auch das Myoepithel differenzieren.



Fotos der IHC-Färbung auf Multi tissue

Resümee AK W3D5A9

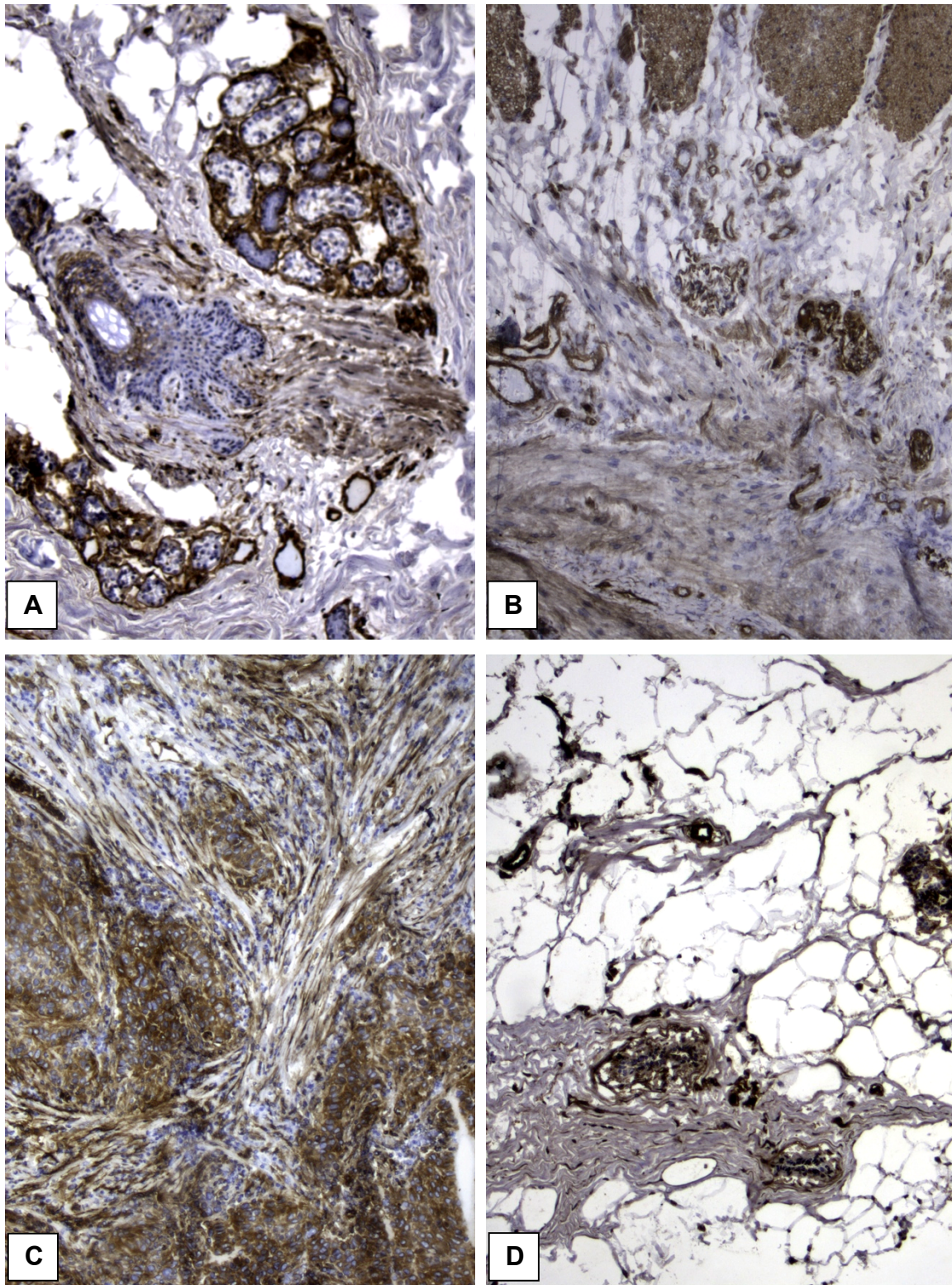


Abbildung 22 Multi tissue, IHC-Färbung mit W3D5A9, Originalvergrößerung

A) Haut x40, B) glatte Muskulatur x40, C) Mamma CA x40, D) Fett x40

Zusammenschau

## Resümee AK W3D5A9

|      | <b>Gewebe-<br/>Typen</b> | <b>Immunhistochemie</b>                           | <b>FACS</b> |
|------|--------------------------|---|-------------|
| I.   | LMS                      | Spezifisch im Zytoplasma<br>3 von 4 LMS-Schnitten | 0 %         |
| II.  | RMS                      | Spezifisch im Zytoplasma<br>5 von 5 RMS-Schnitten | 7 %         |
| III. | LS                       | Spezifisch im Zytoplasma<br>4 von 5 LS-Schnitten  | 18 %        |

Die IHC zeigt für den AK W3D5A9 in drei von vier Fällen der LMS eine positive vereinzelt bis diffuse Zytoplasmafärbung mit mittlerer bis starker Intensität auf 50-100 % der Tumorfläche. Die FACS-Analyse des LMS mit W3D5A9 fiel negativ aus. Bei den Rhabdomyosarkomen waren alle Fälle positiv, bei einer Zytoplasmafärbung von mittlerer bis starker Intensität mit einer vereinzelt und diffusen Verteilung über eine Fläche von 1-75 %. In der Durchflusszytometrie ist das RMS mit W3D4A9 nur bei ca. 7 % der Zellen positiv. Das Zytoplasma des Liposarkoms ist mit W3D5A9 in vier Proben mit einer starken Intensität und einer diffusen bis homogenen Verteilung und einer Fläche von 1-75 % gefärbt. Das Liposarkom mit W3D4A9 ist in der Durchflusszytometrie mit 18 % der Zellen positiv. Die mesenchymalen Stammzellen sind mit 32 % und die Vorhautfibroblasten mit 17 % positiven Zellen im FACS analysiert worden. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der Antikörper W3D5A9 in der Immunhistochemie weitaus besser färbt als der Antikörper W5C5. Beide Antikörper sind gegen dasselbe Antigen, allerdings gegen unterschiedliche Epitope gerichtet (37). Zudem scheint der Antikörper sich besser für die IHC als für die Durchflusszytometrie zu eignen. Die konstanten Färbungen lassen den Marker durchaus für weitere Untersuchungen in Frage kommen.

## Auswertung der FACS-Daten von Sarkomen

## Resümee AK W3D5A9

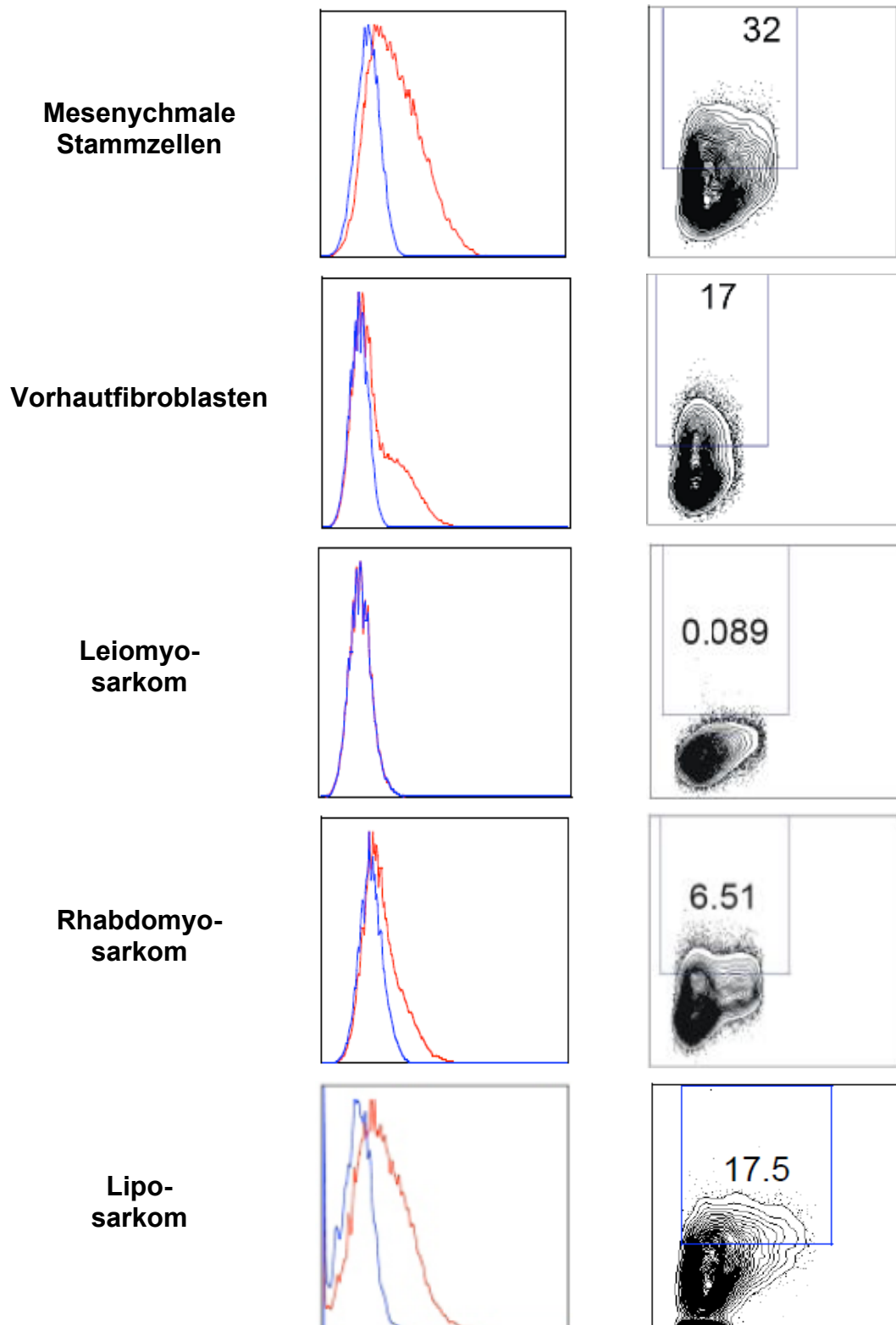


Abbildung 23 AK W3D5A9, mit der Durchflusszytometrie erhobene Daten; links von oben, Zelltyp: mesenchymale Stammzellen, Vorhautfibroblasten, LMS, RMS, LS; mittig Histogramme und rechts Dot Plots mit Angabe der Marker positiven Zellen in Prozent (1)

**3.4.8 VIII. Antikörper 39D5-CD56**Bewertung der IHC-Färbung auf Sarkomen

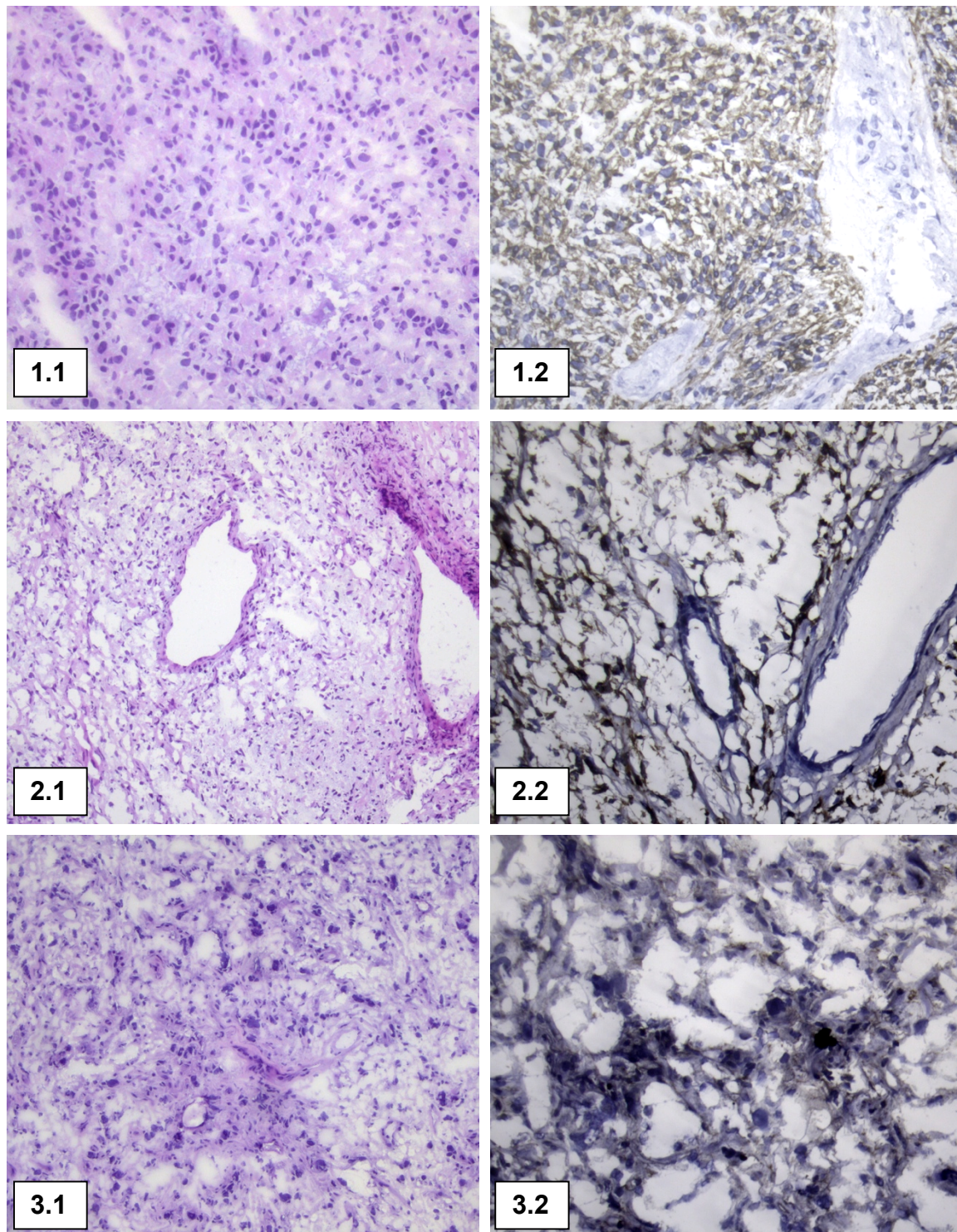
|      | <b>Typen</b> | <b>Intensität, Fläche, Verteilungsart</b>   | <b>Kurzes Fazit</b>             |
|------|--------------|---|---------------------------------|
| I.   | LMS          | Intensität ++, Fläche 75-100 % 1 von 4, homogen, im Zytoplasma  | SP im ZP 1 von 4<br>NEG 3 von 4 |
| II.  | RMS          | Intensität und Fläche ++ 75-100 % 3 von 5, ++ 1-25 % 1 von 5, alle diffus-homogen, im Zytoplasma, 1 von 5 unspezifisch Matrix | SP im ZP 4 von 5<br>NEG 1 von 5 |
| III. | LS           | Intensität +, Fläche 1-25 % 1 von 5, homogen, im ZP   | SP im ZP 1 von 5<br>NEG 4 von 5 |
| IV.  | Gefäße       | Intensität + einmal und +++ zweimal, alle anderen negativ   | POS 3 von 15<br>NEG 12 von 15   |

Ein Leiomyosarkom wurde spezifisch im Zytoplasma der Tumorzellen angefärbt mit einer mittleren Intensität bei einer homogenen Verteilung über 75-100 % der Tumorfläche. Bei den anderen drei Leiomyosarkomen liegt keine spezifische Färbung vor. Beim Rhabdomyosarkom ist spezifisch das Zytoplasma der Tumorzellen angefärbt mit einer einheitlichen mittleren Intensität. Die Verteilung präsentiert sich von diffus bis homogen mit einer Fläche von 50-75 % bei drei von fünf Rhabdomyosarkomen und 1-25 % bei einem RMS. In den zwei weiteren Fällen der RMS, zeigte sich einmal eine unspezifische Matrixfärbung, sowie das andere Mal keine IHC-Färbung des RMS. Ein Liposarkom weist eine homogene spezifische Zytoplasmafärbung der Tumorzellen mit einer schwachen Intensität mit einer Tumorfläche von 1-25 %. Dreimal gibt es eine positive Gefäßfärbung mit einer Intensität schwach bis mittel, in allen anderen Fällen sind die Gefäße negativ.



Fotos der IHC-Färbungen auf Sarkomen

*Resümee AK 39D5-CD56*



**Abbildung 24** Fotos in Spalten: links H.E.-Färbung, rechts IHC-Färbung mit 39D5-CD56

1) Reihe Leiomyosarkom, Patient 4, 1.1 und 1.2 x200 Originalvergrößerung

2) Reihe Rhabdomyosarkom, Patient 10, 2.1 x100 und 2.2 x200 Originalvergrößerung

3) Reihe Liposarkom, Patient 11, 3.1 x 10 und 3.2 x200 Originalvergrößerung



Bewertung der IHC-Färbung auf Multi tissue

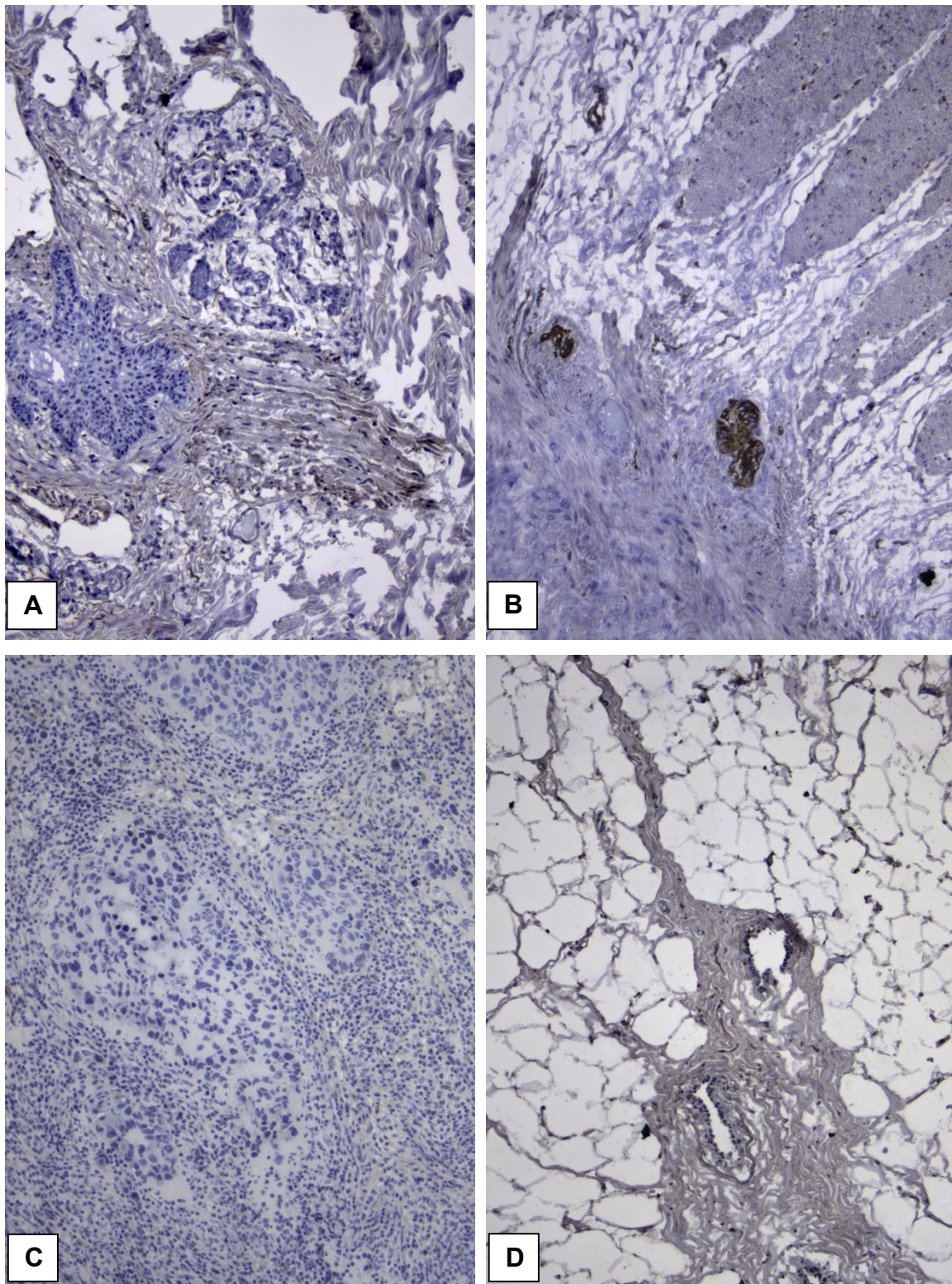
Resümee AK 39D5-CD56

|      | <b>Multi Tissue</b> | <b>Bewertung</b><br><b>Intensität und Fläche</b>   | <b>Kurzes</b><br><b>Fazit</b> |
|------|---------------------|--|-------------------------------|
| I.   | Haut                | <ul style="list-style-type: none"> <li>• + wenig BG-Fasern / extrazellulär</li> </ul>                    | Positiv                       |
| II.  | Glatte Muskulatur   | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Glatte Muskulatur negativ</li> <li>• ++ Nervenfasern</li> </ul> | Negativ                       |
| III. | Fett                | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Fett negativ</li> </ul>   | Negativ                       |
| IV.  | Mamma Karzinom      | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Mamma Karzinom negativ</li> </ul>                               | Negativ                       |

In der Beurteilung der Haut zeigt sich, dass eine positive Färbereaktion an den extrazellulären Bindegewebsfasern stattgefunden hat. In der Auswertung der glatten Muskulatur konnte keine positive Färbung entdeckt werden. Jedoch war ersichtlich, dass die Nerven mit einer mittleren Intensität angefärbt sind. Das Fettgewebe war negativ. Abschließend wurde keine positive Färbung der Tumorzellen im Mamma-Karzinom gesehen.

**Fotos der IHC-Färbung auf Multi tissue**

**Resümee AK 39D5-CD56**



**Abbildung 25 Multi tissue, IHC-Färbung mit 39D5-CD56, Originalvergrößerung:**

**A) Haut x40, B) glatte Muskulatur x40, C) Mamma CA x100, D) Fett, x40**

Zusammenschau*Resümee AK 39D5-CD56*

|      | <b>Gewebe-<br/>Typen</b> | <b>Immunhistochemie</b>                           | <b>FACS</b> |
|------|--------------------------|---|-------------|
| I.   | LMS                      | Spezifisch im Zytoplasma<br>1 von 4 LMS-Schnitten | 93 %        |
| II.  | RMS                      | Spezifisch im Zytoplasma<br>4 von 5 RMS-Schnitten | 64 %        |
| III. | LS                       | Spezifisch im Zytoplasma<br>1 von 5 LS-Schnitten  | 0 %         |

Die Färbung des Leiomyosarkomes ergibt in der Durchflusszytometrie nur 93 % positive Zellen mit dem Antikörper 39D5-CD56. Diese Färbung spiegelt sich in der IHC wieder, in der ein Fall des LMS positiv im Zytoplasma mit einer mittleren Intensität, homogen über eine Fläche von 75-100 % gefärbt wurde. Das Liposarkom hat keine positiven Zellen in der FACS-Analyse mit dem AK 39D5-CD56. In der IHC ist das Zytoplasma der LS nur in einem Fall spezifisch homogen, mit geringer Intensität und einer Fläche von 1-25 % positiv. Von diesen Ergebnissen unterschied sich das RMS, welches in der Durchflusszytometrie mit 46 % positiv für den AK 39D5-CD56 ist. Auch in den IHCs war eine spezifische Bindung in vier Proben zu sehen. Diese war von mittlerer Intensität, alle diffus bis homogen und betraf eine Fläche von 1-100 %, lediglich in einem Fall war nur unspezifisch die Matrix angefärbt. In der Durchflusszytometrie zeigten sich 37 % der Zellen positiv auf CD56. Daher ist eine eindeutige Interpretation nicht möglich. Zudem sind die mesenchymalen Stammzellen in der FACS-Auswertung nur zu unter 1 % und die Vorhautfibroblasten nur zu knapp über 1 % für den Antikörper 39D5-CD56 positiv. Insgesamt gesehen kommt dieser Antikörper aufgrund der geringen Anzahl an positiven Fällen und der inhomogenen Färbungen als Marker bei Weichteilsarkomen nicht in Betracht.

## Auswertung der FACS-Daten von Sarkomen

## Resümee AK 39D5-CD56

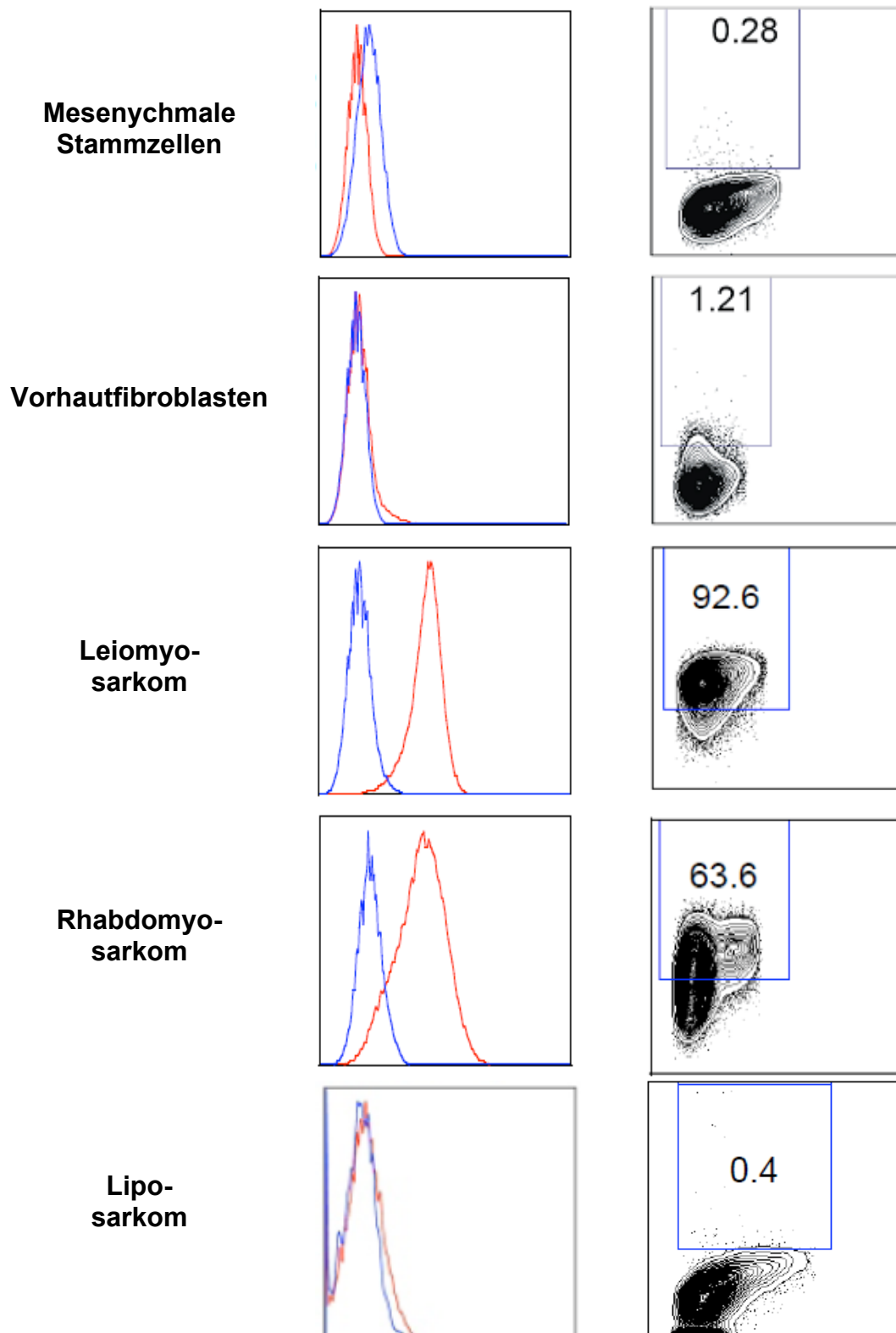


Abbildung 26 AK 39D5-CD56, mit der Durchflusszytometrie erhobene Daten; links von oben, Zelltyp: mesenchymale Stammzellen, Vorhautfibroblasten, LMS, RMS, LS; mittig Histogramme und rechts Dot Plots mit Angabe der Marker positiven Zellen in Prozent (1)

### **3.5 Zusammenschau der acht Antikörper in ihren Ergebnissen: Expression, mögliche Relevanz und Anwendbarkeit**

In der folgenden Tabelle werden die wichtigsten Erkenntnisse bezüglich der IHC-Färbungen und Auswertungen der acht Antikörper zusammengefasst wiedergegeben. Die Namen werden vornweg angeführt, es folgt je eine Spalte zu Expression, möglicher Relevanz, und ob sich daraus ein Stammzell- oder Linienmarker ableiten lässt. Diese Interpretation stützt sich auf die ausführlichen Resümees der jeweiligen acht Antikörper in der IHC- Färbung und FACS-Analyse im Vorfeld.

Die bekannten Charakteristika der Antikörper sind der Tabelle im Kapitel 3.2.1 zu entnehmen. In dieser Arbeit wird versucht, eine phänotypische Analyse des Weichteilsarkomgewebes mit Markern durchzuführen, die eine bekannte Reaktivität gegen mesenchymale, hämatopoetische und gewebespezifische Stammzellen aufweisen (21, 25). Von Interesse ist die Expression bezüglich einer möglichen Relevanz in der klinischen Praxis, da eine differente Expression Rückschlüsse ziehen lässt, z.B. ob Subpopulationen bestehen und somit auf eine hierarchische Struktur innerhalb der untersuchten Zellpopulation geschlossen werden kann. Des Weiteren zeigten Marker-positive Zellen eine vermehrte Proliferation, die Fähigkeit zu dreidimensionaler Sarkosphären-Bildung und eine erhöhte Chemotherapieresistenz (1). Aus den Ergebnissen lässt sich daher eine mögliche Relevanz als diagnostischer Marker sowie Stammzell- und Linienmarker für die klinische Praxis herleiten. Im Hinblick auf die Aussagekraft der folgenden Tabelle wird eine noch vertiefende Validierung empfohlen.

### **3.6 Zusammenfassende Interpretation der Ergebnisse der acht Antikörper**

Interpretation der Ergebnisse der acht Antikörper in der IHC-Färbung unter Einbezug der FACS-Analyse in Hinblick auf Expression, Relevanz und Anwendbarkeit der MSC-Marker.

Abkürzungen: Mesenchymale Stammzelle (MSC), Rhabdomyosarkome (RMS), Leiomyosarkome (LMS), Liposarkome (LS)



| Nr.   | Antikörper       | Expression  | Mögliche Relevanz                                | Stammzell-Marker      | Linien-Marker                                     |
|-------|------------------|---|--|-----------------------|---|
| I.    | CD271            | Zytoplasma<br>diffus - homogen<br><br>RMS, Muskulatur,<br>Nervenfaszikel      | Diagnostischer<br>Marker für RMS,<br>LMS, Nerven | Spekulativ<br>möglich | Möglich für<br><br>RMS > LMS                      |
| II.   | CD318C32         | Zytoplasma<br>diffus - homogen:<br>LMS, RMS, LS<br>und MammaCa                | Diagnostischer<br>Marker für<br>Sarkome          | Spekulativ<br>möglich | Möglich für<br>LMS, RMS ><br>LS                   |
| III.  | W8B2B10          | Zytoplasma<br>homogen LS,<br>diffus- vereinzelt<br>LMS und RMS                | Diagnostischer<br>Marker für<br>Sarkome          | Spekulativ<br>möglich | Möglich für alle<br>Sarkome, hier<br>LMS, LMS, LS |
| IV.   | W3C4-<br>CD349   | Nicht für IHC<br>geeignet<br><br>Gefäße                                       | Für Gefäße                                       | Kein Anhalt           | Kein Anhalt                                       |
| V.    | W7C5F8-<br>CD109 | Zytoplasma diffus<br>RMS > LS > LMS<br><br>Gefäße                             | Diagnostischer<br>Marker für<br>Sarkome          | Spekulativ<br>möglich | Möglich für alle<br>Sarkome, hier<br>LMS, LMS, LS |
| VI.   | W5C5             | Unspezifisch für<br>Sarkome<br><br>Gefäße                                     | Für Gefäße                                       | Zu<br>unspezifisch    | Zu<br>unspezifisch                                |
| VII.  | W3D5A9           | Zytoplasma diffus<br>RMS > LMS, LS,<br>Mammakarzinom,<br>Nerven<br><br>Gefäße | Unspezifisch, färbt<br>zu viele<br>Gewebearten   | Zu<br>unspezifisch    | Zu<br>unspezifisch                                |
| VIII. | 39D5-CD56        | Zytoplasma<br>diffus – homogen<br>RMS   | Diagnostischer<br>Marker für RMS                 | Spekulativ<br>möglich | Möglich für<br>RMS                                |



I. Der Antikörper CD271 zeigte eine durchgehende diffuse bis homogene Bindung mit starker spezifischer Färbereaktion im Zytoplasma im RMS und einer positiven Detektion von über 81 % in der Durchflusszytometrie. Der AK CD271 ist als NGFR beschrieben und färbt auch in unserer Studie Nervenfaszikel. Eine Validierung ist wegen intraindividuelle Expression innerhalb derselben Sarkomentität notwendig. CD271 ist somit ein potentieller mesenchymaler Linienmarker für myogen differenzierte Sarkome und könnte eher für Rhabdomyosarkome als Leiomyosarkome geeignet sein.

II. Eine fortführende Validierung mit CD318C32 als möglicher diagnostischer Marker für Sarkome wäre von Interesse; in dieser Arbeit vor allem für Leiomyosarkome und Rhabdomyosarkome, bedingt auch für Liposarkome. Die schlechte Detektion in der FACS-Analyse lässt darauf schließen, dass der Antikörper für die IHC-Färbung geeigneter ist, da es hier zu einer spezifischen Oberflächen und Zytoplasma IHC-Färbereaktion der Sarkome kommt. Der Antikörper CD313C32 könnte ein interessanter möglicher mesenchymaler Linienmarker sein. Zudem wurde jedoch auch das Zytoplasma des Mammakarzinomes spezifisch angefärbt.

III. Ein sehr interessanter potentieller mesenchymaler Linienmarker könnte W8B2B10 für Sarkome sein. Dieser färbte in allen Dignitäten der Sarkome spezifisch im Zytoplasma und im Multi tissue lediglich die Drüsen der Epithelschicht. Auch in der FACS-Analyse zeigt sich dieses positive Ergebnis, so dass weitere Untersuchungen gerechtfertigt wären.

IV. Die Ergebnisse mit dem Antikörper W3C4-CD349 ergaben unspezifische Färbereaktionen. Es wird davon ausgegangen, dass der Antikörper für die FACS-Analyse geeigneter ist als für die Immunhistochemie. Eine diagnostische Relevanz für Sarkome konnte nicht erhoben werden.

V. Die Affinität von W7C5F8-CD109 zu Gefäßen ist in anderen wissenschaftlichen Arbeiten schon dokumentiert. Die intraindividuelle Varianz miteinbeziehend zeigte sich eine spezifische IHC-Färbung in allen getesteten Sarkomtypen, welche sich in der FACS-Analyse widerspiegelte. Ebenso waren

auch die MSCs und Vorhautfibroblasten in der Durchflusszytometrie zu über 80 % positiv, so dass es sich um einen möglichen mesenchymalen Linienmarker handeln könnte.

VI. Der Antikörper W5C5 färbte alle Gefäße im Sarkomgewebe sowie im Kontrollgewebe spezifisch an und erweist sich somit als Gefäßmarker. In den Auswertungen der IHC-Färbungen zeigten sich diverse unspezifische Färbereaktionen, ebenso konnte keine hohe Detektion in der FACS-Analyse gemessen werden. Daher wird W5C5 als uninteressant für die Sarkome mit den hier angewandten Methoden erachtet.

VII. Die IHC-Reaktion mit W3D5A9 zeigte sich in multiplen Geweben positiv. Bekannt ist der Antikörper für seine Gefäßbindung. Ebenso färbte er Mammakarzinom, Nerven, BG-Fasern und glatte Muskulatur im Kontrollgewebe. Die Sarkome wurden zwar spezifisch gefärbt in der IHC-Färbung, jedoch zeigt sich im Vergleich zur FACS-Analyse mit geringer prozentualer Bindungsreaktion keine eindeutige Tendenz als spezifischer diagnostischer Marker für Sarkome.

VIII. Der Antikörper 39D5-CD56 färbt das RMS spezifisch mit einer diffusen bis homogenen IHC-Färbereaktion im Zytoplasma. In der Durchflusszytometrie bestand eine Bindungsreaktion der RMS mit dem Antikörper von über 45 %. Die Ergebnisse zeigen, dass 39D5-CD56 von einer möglichen Relevanz als diagnostischer Marker für RMS bzw. mesenchymaler Linienmarker für quergestreifte Muskulatur ist, da die glatte Muskulatur in der IHC-Färbung negativ war.

Zusammenfassend wurde in der Arbeitsgruppe in den Ergebnissen der FACS-Analyse alle MSCs und Vorhautfibroblasten positiv detektiert durch die Antikörper CD271, CD318C32, W8B2B10, W7C5F8 und 39D-CD56. Ebenso färbten diese oben angeführten Antikörper in der IHC-Färbung spezifisch in den Sarkomen das Zytoplasma an. Somit könnten diese fünf Antikörper potenzielle mesenchymale Linienmarker für Sarkome sein. In der FACS-Analyse binden die Antikörper CD271, CD318C32, W8B2B10 und 39D5-CD5 an 5% der

Vorhautfibroblasten. Ausgehend von der Hypothese, dass auch Fibroblasten in Kultur Subpopulationen von Stamm- und Vorläuferzellen enthalten, besteht spekulativ eine Eignung der von den genannten Antikörpern gebundenen Epitope als mesenchymale Stammzellmarker.

## 4 Diskussion

Bei Leukämien, die ebenfalls zu den seltenen Erkrankungen gehören, kann mit Hilfe der Immunphänotypisierung eine klinische Einschätzung und eine Vorhersage des Therapieansprechens getroffen werden (22). Ein Grundverständnis des Expressionsprofils der verschiedenen Differenzierungsmarker in Weichteilsarkomen des Erwachsenenalters würde eventuell zu verbesserten Behandlungsmöglichkeiten führen, so wie es bereits bei Leukämien der Fall ist. Diese Hypothese entspricht der Tumorstammzell-Hypothese, nach der maligne Tumoren eine Zellpopulation enthalten, die zur Aufrechterhaltung des Tumors führt, wohingegen der Großteil der Tumorzellen die Fähigkeit zur Selbsterneuerung verloren hat (24). Analog zu leukämischen Stammzellen könnten Tumorstammzellen auch ihrem Pendant aus gesundem Gewebe entsprechen. Die Vermutung, dass Sarkome aus mesenchymalen Stammzellen entstehen, wird durch neueste Erkenntnisse unterstützt (14-17). Mesenchymale Stammzellen wurden durch Plastikadhärenz verschiedener Knochenmarkzellen isoliert, bis jetzt eine prospektive Isolierung mit Hilfe eines neuen Antikörper-Panels möglich war (21). In dieser Arbeit wird versucht, eine phänotypische Analyse des Weichteilsarkomgewebes mit Markern durchzuführen, die eine bekannte Reaktivität gegen mesenchymale, hämatopoetische und gewebsspezifische Stammzellen aufweisen (21, 25). Die bei der Immunhistochemie gezeigte interindividuelle Varianz der Prozentzahl der gefärbten Zellen unterstreicht nochmals den Hypothesen-Charakter der Ergebnisse. Das hier verwendete Antikörper-Panel gegen mesenchymale Stammzellen zeigte bereits in Vorarbeiten der Arbeitsgruppe Färbungen, sowohl von Sarkomzelllinien als auch an Primärgewebe der häufigsten Sarkomentitäten. Verschiedene Antikörper färbten Subpopulationen in den Sarkomzelllinien, was nach mehreren Passagen auf eine hierarchische Struktur schließen lässt. Des Weiteren zeigten die Marker-positiven Zellen eine vermehrte Proliferation im Vergleich mit Marker-negativen Zellen (1). Die Tatsache, dass alle hier getesteten Antikörper sowohl auf mesenchymalen Stammzellen, als auch auf embryonalen und adulten Fibroblasten Färbungen

zeigen, wäre mit der Hypothese vereinbar, dass alle genannten Zelltypen Bestandteil einer großen Fibroblastenfamilie sind (26). Trotzdem scheinen manche Marker, die sowohl auf mesenchymalen Stammzellen, als auch auf Sarkomen exprimiert sind, spezifischer für maligne Zellen zu sein verglichen mit den Fibroblasten: TNAP, CD271, W5C5 und CD344 (1). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass Tumorstammzellmarker, die bei der Identifizierung von epithelialen oder leukämischen Stammzellen hilfreich sind, wie zum Beispiel CD133, CD117 und CD34, für die Identifikation von Sarkomstammzellen oder Sarkomprogenitorzellen keine Rolle spielen (1).

Die interindividuelle Varianz der Expressionsmuster einzelner Sarkomproben zeigte sich besonders stark bei den Leiomyosarkomen: in der IHC färbte der Antikörper gegen CD271 gar nicht, während bei der FACS-Analyse immerhin zwischen 1 % und 65 % der Zellen positiv für CD271 waren. Eine ähnliche Schwankung der Resultate zeigte sich bei den Liposarkomen: in der FACS-Analyse waren nur ca. 15 % positive CD271-Zellen, bei der IHC war jedoch eine Tumorfläche von 1-75 % in drei Fällen gefärbt. Ein interessantes und homogeneres Bild erbrachte die Auswertung der Rhabdomyosarkome. In der Durchflusszytometrie waren über 80 % positive Zellen detektierbar und in der IHC wurden ebenfalls alle RMS über eine Tumorfläche von 25-100 % positiv diffus bis homogen mit mittlerer bis starker Intensität im Zytoplasma angefärbt. Im Multi tissue-Block waren teils die glatte Muskulatur und die glatte Muskulatur der Gefäße gefärbt und ebenso das Myoepithel in allen Kontrollgeweben. In der FACS-Analyse der Arbeitsgruppe zeigte sich eine Skelettmuskulatur-Zelllinie ebenfalls mit über 55 % stark positiv, bei den Vorhautfibroblasten hingegen waren lediglich unter 1 % der Zellen positiv. In der Haut färbten sich positiv: Zytoplasma in der Basalschicht der Epidermis, Kapillaren, Ganglion und Nervenfaszikel. Bei den getesteten Markern wurde nur CD271 spezifisch in MSC und Sarkomen, aber nicht in Fibroblasten exprimiert. CD271 ist der am häufigsten gebrauchte MSC-Marker (27) und aus Knochenmark gewonnene klonogene MSCs befinden sich ausschließlich in der CD271 positiven Fraktion. Zudem wurde CD271 für die prospektive Isolierung von multipotenten adipozytischen Stammzellen verwendet (28) und von

Melanom initizierenden Zellen (29). CD271 gehört zur Tumornekrosefaktor-Superfamilie und ist Rezeptor für TNF, BDNF, Neurotrophin 3 und Neurotrophin 4 (30). Es konnte in absoluter Übereinstimmung mit MSCs gezeigt werden, dass eine starke CD271-Expression zu den typischen Eigenschaften von Sarkomzellen gehört. Des Weiteren korreliert die CD271 Expression sowohl in primären Sarkomproben, als auch in Sarkomzelllinien immer mit einem stark vermehrten Proliferationspotential und mit einer verstärkten Fähigkeit zur Bildung von Sarkosphären (1). Auch primäre Doxorubicin-Resistenz ist in CD271 positiven Zellen höher, was wiederum auf eine hierarchisch exklusive Position von CD271 in normalem und malignem Gewebe deutet (31, 1).

Die IHC-Färbungen mit dem Antikörper CD318 (CUB-1) zeigten sich auf allen drei verwendeten Sarkomtypen in 13 von 14 Fällen positiv. Die Färbung mit AK CD318 war immer diffus bis homogen mit einer leichten bis starken Intensität über eine Tumorfläche von 1-100 %. In der Durchflusszytometrie waren ca. 40 % der Zellen im LMS positiv, sowie ca. 1 % beim LS und 8 % beim RMS. Auch die FACS-Messung der MSCs erbrachten nur ca. 2 % positive Zellen. Auffällig war die starke Färbung im Mammakarzinom im desmoplastischen Stroma, sowie dass das Spinosum der Epidermis in der Haut stark und das Epithel der Hautanhangsdrüsen zum größten Teil angefärbt wurden. CUB-1 ist nicht nur auf Subpopulationen von hämatopoetischen Stammzellen exprimiert, sondern auch auf Zellen mit mesenchymalem und neuralem Stammzell- bzw. Vorläuferzell-Phänotyp (32). Dies lässt darauf schließen, dass mit diesem Antikörper gegen das Antigen CD318 ein größeres Spektrum an Stammzellen abgedeckt wird, als es bei den Antikörpern gegen CD34 oder CD133 der Fall ist (32, 1). CD318 ist auf vielen verschiedenen Zelltypen exprimiert. Besonders in Colon- und Lungenkarzinomen ist CD318 überexprimiert und die Expressionsrate korreliert mit der Metastasierung dieser Tumoren. Die Funktion von CD318 ist bis jetzt noch nicht vollständig verstanden, aber es scheint in der frühen Hämatopoese eine Rolle zu spielen (32, 33). Aufgrund der geringen Probenanzahl und inkohärenten Ergebnisse zwischen IHC und



FACS-Analyse lassen sich keine Rückschlüsse für einen spezifischen Sarkomstammzell-Marker ziehen.

Das Liposarkom wurde in der IHC in allen Fällen mit dem Antikörper W8B2B10 im Zytoplasma homogen mit einer mittleren bis starken Intensität über eine Fläche von 1-100 % gefärbt. In der FACS-Analyse wurden ca. 40 % positive Zellen detektiert für das LS. Der Antikörper W8B2B10 färbte in der IHC vier von neun LMS und RMS vereinzelt über eine Tumorfläche von 1-100 % mit leichter bis mittlerer Intensität im Zytoplasma. Die negativen Fälle könnten durch die unterschiedliche Expressionsstärke der Subpopulationen bedingt sein. In der FACS-Analyse waren die mesenchymalen Stammzellen zu ca. 11 % positiv für den AK W8B2B10. TNAP, kürzlich als identisch mit MSCA-1 identifiziert (34), wird stark auf MSCs, aber nicht auf Fibroblasten exprimiert. In Sarkomen wird TNAP von Subpopulationen der Sarkomzellen exprimiert, wobei in myogenen Sarkomen diese Subpopulationen größer sind als in anderen Sarkomentitäten (1). In der Durchflusszytometrie waren ca. 11 % positive Zellen beim LMS und 71 % positive Zellen beim RMS messbar. Zu erwägen wäre, ob die Malignität mit der Expressionsstärke korreliert. Andererseits erbrachte die FACS-Analyse aus der Arbeitsgruppe für die Skelettmuskulatur aus gesundem Gewebe auch eine positive Detektion von ca. 55 % der Zellen mit dem AK W8B2B10. In der IHC-Färbung des Multi tissue-Blocks war die glatte Muskulatur nicht angefärbt, lediglich die Drüsen in der Epithelschicht. Dieses Ergebnis bei zu geringer Validierung lässt keine allgemeinen Rückschlüsse ziehen, ob W8B2B10 allgemein an die beschriebene Subpopulation der myogenen Strukturen bindet, woraufhin die FACS-Daten deuten, da unter Einbeziehung der IHCs die myogenen Sarkomzellen gefärbt wurden und nicht die glatte Muskulatur aus gesundem Gewebe.

Die IHC-Färbung mit W3C4 erbrachte für die Leiomyosarkome lediglich eine unspezifische Färbung, in der FACS-Analyse hingegen zeigten sich fast 77 % der Zellen positiv. Bei den LS wurde eine Tumorfläche von 1-75 % und in den RMS von 1-25 % in je zwei von fünf Fällen der IHC-Färbungen im Zytoplasma

mit einer diffusen Verteilung und schwachen Intensität gefärbt, während in der Durchflusszytometrie beim Liposarkom fast 100 % und beim RMS 90 % positive Zellen detektiert wurden. Auch die mesenchymalen Stammzellen wiesen 90 % positive W3C4-Zellen auf. Die IHC-Färbung des Multi tissue-Blocks spiegelte eine große Bindungsvarianz des W3C4 wieder, da hier positive Anfärbungen in der Basalmembran, in den Hautanhangsgebilden und Gefäßen, sowie der Bindegewebs- und Kollagenfasern, der glatten Muskulatur und dem desmoplastischem Stroma in der Mammakarzinomprobe vorlagen. Die FACS-Analyse mit dem Antikörper W3C4 erbrachte ca. 65 % für W3C4 positive Vorhautfibroblasten und fast 80 % positive Zellen in der Skelettmuskulatur aus der Arbeitsgruppe. W3C4 ist identifiziert als Antikörper gegen CD349, ein Rezeptor für die Aktivierung des Wnt/ $\beta$ -catenin Signalwegs. CD349 ist in verschiedenen Organen bzw. Geweben wie Niere, Gehirn, Augen, Keimdrüsen, Skelettmuskulatur exprimiert. Außerdem kommt CD349 auf mesenchymalen Stammzellen und neuronalen Vorläuferzellen vor. CD349 gehört zur Familie der Frizzled-Rezeptoren, die eine große Rolle in der Zellalterung, Zellproliferation, Zellmigration, Organentwicklung und Ausbildung von Gewebestrukturen spielen. CD349 ist ein wichtiger Faktor für die Entwicklung des Nervensystems und entscheidend für die Entwicklung des Hippocampus (35). Aus der durchgeführten Studie ergibt sich aus den FACS-Daten eine ausgeprägte Positivität für den AK W3C4 zwischen den Sarkomen sowie den MSCs, welche sich jedoch immunhistochemisch nicht reproduzieren lässt. Eventuell ist dieser Antikörper auch ungeeignet für die Immunhistochemie.

Der Antikörper W7C5F6 färbte die LMS in der IHC in zwei von vier Fällen im Zytoplasma diffus mit leichter bis mittlerer Intensität über eine Tumorfläche von 25-50 %. Die FACS-Daten erbrachten ca. 10 % positive Zellen für den AK W7C5F8, jedoch wurden in einer LMS-Zelllinie der Arbeitsgruppe 94.5 % positive Zellen gemessen. Die IHC Anfärbungen der RMS und LS erbrachten eine von fünf bzw. zwei von fünf negative Proben, alle anderen Fälle waren positiv im Zytoplasma gefärbt und bedeckten die Tumorfläche mit 1-75 % bei einer mittleren bis starken Intensität und einer diffusen Verteilung. Das gleiche

Bild zeigte sich in der Durchflusszytometrie: im RMS waren über 60 % der Zellen positiv, im LS über 80 % und auch bei den mesenchymalen Stammzellen lagen fast 85 % positive Zellen für W7C5F6 vor. Die Varianz lässt sich am ehesten durch die individuelle Expression des Antigens CD109 der einzelnen Sarkomproben erklären. Der Oberflächenmarker W7C5F8 wurde als CD109 identifiziert und wird sowohl auf aktivierten T-Zellen und aktivierten Thrombozyten, als auch auf Gefäßendothel exprimiert. Die Funktion von CD109 ist weitgehend unbekannt, wird aber mit verschiedenen Gerinnungsstörungen in Verbindung gebracht (25, 36). Die Gefäße in den Sarkomen wurden in 14 von 15 Fällen mit mittlerer bis starker Intensität mit dem AK W7C5F8 gefärbt, jedoch nicht im gesunden Kontrollgewebe. Ebenso mit starker Intensität färbte sich in der IHC das desmoplastische Stroma im Mammakarzinom an. Interessant hierbei ist, dass die Gefäße nur in Sarkomen, nicht aber in gesundem Kontrollgewebe gefärbt wurden. Es stellt sich die Frage, ob die starke Expression von CD109 in Sarkomen mit der Proliferation bzw. Aggressivität korreliert.

Die Färbungen mit W5C5 ergaben in der IHC für das Leiomyosarkom sowie das Rhabdomyosarkom jeweils nur einen positiven Fall. Dieser wurde jeweils mit einer mittleren Intensität über eine Tumorfläche von 50-75 % im Zytoplasma angefärbt, mit einer vereinzelter Verteilung im LMS und einer diffusen im RMS. In der Durchflusszytometrie waren keine positiven Zellen für das LMS messbar. Beim RMS waren fast 15 % der Zellen positiv. Das LS war in zwei von fünf Fällen positiv im Zytoplasma diffus verteilt mit mittlerer Intensität über eine Tumorfläche von 1-75 % mit W5C5 angefärbt. Die Durchflusszytometrie des LS erbrachte für den Antikörper W5C5 ca. 15 % positive Zellen und bei den mesenchymalen Stammzellen fast 28 % positive Zellen. W5C5 ist ein Marker, der hilfreich ist für die prospektive Isolierung von stark angereicherten Knochenmarksstammzellen (21). W5C5 ist in vielen Zellen von primären synovialen Sarkomen, Rhabdomyosarkomen und Liposarkomen und ihren entsprechenden Zelllinien exprimiert (1). Auch Vorhautfibroblasten exprimieren diesen Marker mit einem Anteil von bis zu 15 %, was ihn zu einem eher unspezifischen Marker, mit der Möglichkeit als Co-

Marker für Sarkomprogenitorzellen zu fungieren, macht (1). Auffallend bei den IHCs war, dass die Gefäße sowohl im Sarkomgewebe, wie auch in allen Gefäßen des Multi tissue positiv mit im Durchschnitt mittlerer bis starker Intensität waren. Zudem zeigte sich das im gesunden Gewebe die glatte Muskulatur und das Myoepithel mittelstark gefärbt wurden, in der Durchflusszytometrie-Messung der Arbeitsgruppe ergaben sich bei der Skelettmuskulatur nur ca. 2 % positive Zellen.

In einer Publikation von Sivasubramaniyan et al. (37) wurden sowohl der Antikörper W3D5A9 als auch W5C5 als Antikörper gegen sushi domain containing 2 (SUSD2) identifiziert. Aufgrund der unterschiedlichen Epitope der Antikörper ist die Färbung der beiden Antikörper in Sarkomen und Kontrollgeweben nicht absolut identisch. Mit dem Antikörper W3D5A9 zeigte sich eine höhere Bindungsaffinität im Zytoplasma der Sarkome. Alle positiv gefärbten Sarkomproben wurden durch den AK W3D5A9 mit einer vereinzelt bis diffus Verteilung der Tumorfläche von 50-100 % im Zytoplasma angefärbt. Dies betraf alle Fälle der Rhabdomyosarkome, bei den LMS und LS war jeweils eine Probe negativ. Die Matrix war in fast allen Fällen unspezifisch gefärbt. In der FACS-Analyse zeigte sich für das LMS keine Oberflächen-Expression während beim LS ca. 18 % und das RMS ca. 7 % positive Zellen für W3D5A9 nachweisbar waren. Bei den mesenchymalen Stammzellen zeigten ca. 32 % der Zellen eine Oberflächen-Expression für W3D5A9 und die Vorhautfibroblasten ca. 17 %. Im Vergleich mit W5C5 ist für W3D5A9 hervorzuheben, dass alle Gefäße der Sarkome und des Multi tissue-Blocks mit durchschnittlich einer mittleren bis starken Intensität angefärbt waren. Ebenso waren wieder das Myoepithel, sowie die glatte Muskulatur gefärbt, zusätzlich noch Bindegewebefasern und Nerven. Beide Antikörper W5C5 und W3D5A9 binden an die sushi domain containing 2 (SUSD2). Insgesamt wurden in 37 von 38 Fällen die Gefäße positiv angefärbt, dies eröffnet die Interpretationsmöglichkeit, ob SUSD2 auf Gefäßen im Allgemeinen exprimiert wird. W3D5A9 war der einzige Antikörper, welcher das Zytoplasma des Mammakarzinoms homogen mit einer mittleren Intensität färbt, aber nur leicht

das desmoplastische Stroma. Es wurde in dieser Studie keine weiteren Fälle erhoben, daher kann keine Allgemeinaussagekraft erhoben werden.

Bei Antikörper 39D5 zeigte sich eine deutliche Differenz zwischen den IHC- und den FACS-Ergebnissen. Das Liposarkom wurde durch den Antikörper 39D5 im Zytoplasma mit einer mittleren Intensität und homogenen Verteilung auf 1-100 % der Tumorfläche gefärbt, in der FACS-Analyse wurden jedoch nur 0.4 % positive Zellen gemessen. Die LMS wurden nur in einem Fall mit AK 39D5 im Zytoplasma prozentual über eine Fläche des Tumors von 75-100 % in homogener Verteilung gefärbt, in der Durchflusszytometrie wurden ca. 92 % positive Zellen detektiert. Für das RMS ergab sich in der FACS-Analyse eine positive Bindung mit dem AK 39D5 von fast 64 %. In der IHC waren vier von fünf Fällen positiv mit einer diffusen bis homogenen Verteilung über eine Tumorfläche von 1-100 % bei einer mittleren Intensität im Zytoplasma. Die mesenchymalen Stammzellen waren in der Durchflusszytometrie nur zu 0.28 % gefärbt und die Vorhautfibroblasten zu 1.21 %. Eine in der Arbeitsgruppe erhobene FACS-Analyse zur Skelettmuskulatur ergab über 36 % positive 39D5-Zellen. Im Multi tissue-Block waren lediglich Nervenfasern und Bindegewebsfasern mit leichter bis mittlerer Anfärbung positiv. CD56 oder NCAM wird als Marker für NK- und NK-T-Zellen verwendet. Außerdem kommt CD56 im Gehirn, lymphatischen und myeloischen Leukämien, kleinzelligem Bronchialkarzinom und Tumoren neuronalen Ursprungs vor. Der hier verwendete Antikörper ist gegen ein Epitop gerichtet, das nicht auf NK- und NK-T-Zellen vorkommt, sondern zur Isolierung mesenchymaler Stammzell-Subpopulationen verwendet wurde (23). Eine weiterverwertbare Aussage konnte nicht getroffen werden.

Eine Immunphänotypisierung durch ein einheitliches Differenzierungsmuster gestaltet sich bei den Weichteilsarkomen bedingt durch die verschiedenen Sarkomtypen schwierig. Im Hinblick auf die Ergebnisse ist von einer hohen interindividuellen Varianz der Expression der Antigene auszugehen. Hierdurch bedingt kam es bei den IHC-Färbungen kaum zu einem homogenen Färbemuster der Antikörper. Mit der IHC konnte die Hypothese der Expression

einer Subpopulation unterstrichen werden. Die Expression von W5C5, TNAP und CD271 zeigte Subpopulationen mit hohem Proliferationspotential auf, was wiederum auf eine potentielle Hierarchie in Sarkomzellen schließen lässt (1). Perspektivisch könnte eine fortführende Validierung des Expressionsprofil ausgehend von einer Subpopulation mit einer höheren primären Tumorprobenzahl mittels IHC-Färbung vergleichend mit FACS-Analyse unter Einbeziehung des klinischen Verlaufes interessant sein. Eventuell könnten Rückschlüsse bezüglich einer hoch proliferativen Subpopulation und der Vorhersage des Krankheitsverlaufes gezogen werden.



## 5 Zusammenfassung

Diese Arbeit liefert eine Vielzahl an Daten für ein funktionelles Expressionsmuster von neuen MSC-Markern auf Sarkomen, MSCs und Fibroblasten. Verschiedene co-exprimierte spezifische MSC-Marker sind wahrscheinlich nicht spezifisch für Weichteilsarkome.

Um das Expressionsprofil im primären Tumorgewebe (Rhabdomyosarkom, Leiomyosarkom und Liposarkom) darzustellen, wurde die Immunhistochemie (IHC) gewählt, in der sich eine Bindung des primären Antikörpers in einer Färbereaktion zeigt. Zur Einordnung einer spezifischen Färbung dienten zusätzlich Positiv- und Negativkontrollen in Form eines Multi tissue-Blocks (Haut, glatte Muskulatur, Fett und Mamma Karzinom) und einer Hämatoxylin-Eosin-Färbung des jeweiligen Gewebes. Aufgrund der in der Arbeitsgruppe erstellten FACS-Daten der Sarkome, mesenchymalen Stammzellen und Vorhautfibroblasten wurden acht Antikörper ausgewählt, um sie weiter an primärem Sarkomgewebe mittels IHC zu erproben.

Eine Immunphänotypisierung durch ein einheitliches Differenzierungsmuster gestaltet sich bei den Weichteilsarkomen bedingt durch die verschiedenen Sarkomtypen erschwert. Zusammenfassend ist eine hohe interindividuelle Varianz der Antigenexpression festzustellen. Hierdurch bedingt kam es bei den IHC-Färbungen kaum zu einem homogenen Färbemuster durch die Antikörper.

Ein Grundverständnis des Expressionsprofils in Weichteilsarkomen würde eventuell verbesserte Behandlungsmöglichkeiten implizieren, so wie bereits bei der Leukämie (22). Zur Unterstützung der Tumorstammzellen-Hypothese, bei der eine Zellsubpopulation zur Aufrechterhaltung des Tumors führt (24), wäre die Identifikation verschiedener spezifischer Sarkom-Marker essentiell. Die Vermutung, dass Sarkome aus MCSs entstehen, wird stark unterstützt (14-17). Die Tatsache, dass alle hier getesteten Antikörper sowohl auf mesenchymalen Stammzellen, als auch auf embryonalen und adulten Fibroblasten Färbungen zeigen, zeigt, dass es sich um eine große Fibroblasten Familie handelt (26). Trotzdem scheinen manche Marker, die sich sowohl mesenchymale

Stammzellen, als auch Sarkome teilen, spezifischer für maligne Zellen verglichen mit den Fibroblasten: TNAP, CD271, W5C5 und CD344 zu sein (1). Die IHC-Färbemuster im Zytoplasma präsentierten sich oft inhomogen innerhalb einer Sarkomgruppe, welches die Hypothese einer Subpopulation unterstreicht. Die Expression von W5C5, TNAP und CD271 zeigte Subpopulationen mit hohem Proliferationspotential auf, was wiederum auf eine potentielle Hierarchie in Sarkomzellen schließen lässt (1). SUDS2 wird mit hoher Wahrscheinlichkeit spezifisch in Gefäßen angefärbt. W3D5A9 färbte mit mittlerer Intensität in der IHC das Mammakarzinom an.

Perspektivisch könnte eine fortführende Validierung des Expressionsprofils ausgehend von einer Subpopulation mit einer höheren primären Tumorprobenzahl mittels IHC-Färbung vergleichend mit FACS-Analyse unter Einbeziehung des klinischen Verlaufes interessant sein. Eventuell könnten Rückschlüsse bezüglich einer hoch proliferativen Subpopulation und die Vorhersage des Krankheitsverlaufes gezogen werden.

## 6 **Abbildungs- und Tabellenverzeichnis**

|   |    |
|---|----|
| Abbildung 1 Beispiel mit CD109, links für Histogramme und rechts für Dot Plots .....  | 24 |
| Abbildung 2 Fotos vom Multi tissue, H.E.-Färbung, Originalvergrößerung: A) Haut x40, B) glatte Muskulatur x40, C) Mamma CA x40, D) Fett x40 .....   | 25 |
| Abbildung 3 Fotos in Spalten: links H.E.-Färbung, rechts IHC-Färbung mit AK CD271 1) Reihe Leiomyosarkom, Patient 3, 1.1 x200 und 1.2 x100 Originalvergrößerung.....  | 29 |
| Abbildung 4 Multi tissue, IHC-Färbung mit AK CD271, Originalvergrößerung: A) Haut x40, B) glatte Muskulatur x40, C) Mamma CA x40, D) Fett x100 .....  | 31 |
| Abbildung 5 AK CD271, mit der Durchflusszytometrie erhobene Daten; links von oben, Zelltyp: mesenchymale Stammzellen, Vorhautfibroblasten, LMS, RMS, LS; mittig Histogramme und rechts Dot Plots mit Angabe der Marker positiven Zellen in Prozent (1) .....    | 33 |
| Abbildung 6 Fotos in Spalten: links H.E.-Färbung, rechts IHC-Färbung mit AK CD318C32 1) Reihe Leiomyosarkom, Patient 1, 1.1 und 1.2 x200 Originalvergrößerung 2) Reihe Rhabdomyosarkom, Patient 8, 2.1 x100 und 2.2 x100 Originalvergrößerung .....             | 35 |
| Abbildung 7 Multi tissue, IHC-Färbung mit AK CD318C32, Originalvergrößerung: A) Haut x40, B) glatte Muskulatur x40, C) Mamma CA x40, D) Fett x100 .....   | 37 |
| Abbildung 8 AK CD318C32, mit der Durchflusszytometrie erhobene Daten; links von oben, Zelltyp: mesenchymale Stammzellen, Vorhautfibroblasten, LMS, RMS, LS; mittig Histogramme und rechts Dot Plots mit Angabe der Marker positiven Zellen in Prozent (1) ..... | 39 |
| Abbildung 9 Fotos in Spalten: links H.E.-Färbung, rechts IHC-Färbung mit AK W8B2B10 1) Reihe Leiomyosarkom, Patient 1, 1.1 und 1.2 x200 Originalvergrößerung 2) Reihe Rhabdomyosarkom, Patient 6, 2.1 x100 und 2.2 x200 Originalvergrößerung .....              | 41 |
| Abbildung 10 Multi tissue, IHC-Färbung mit AK W8B2B10, Originalvergrößerung: A) Haut x40, B) glatte Muskulatur x100, C) Mamma CA x40, D) Fett x100 .....  | 43 |
| Abbildung 11 AK W8B2B10, mit der Durchflusszytometrie erhobene Daten; links von oben, Zelltyp: mesenchymale Stammzellen, Vorhautfibroblasten, LMS, RMS, LS; mittig Histogramme und rechts Dot Plots mit Angabe der Marker positiven Zellen in Prozent (1) ..... | 45 |

Abbildung 12 Fotos in Spalten: links H.E.-Färbung, rechts IHC-Färbung mit AK W3C4 1) Reihe Leiomyosarkom, Patient 2, 1.1 und 1.2 x200 Originalvergrößerung 2) Reihe Rhabdomyosarkom, Patient 9, 2.1 x100 und 2.2 x200 Originalvergrößerung 3) Reihe Liposarkom, Patient 12, 3.1 x100 und 3.2 x200 Originalvergrößerung ..... 47

Abbildung 13 Multi tissue, IHC-Färbung mit AK W3C4, Originalvergrößerung: A) Haut x40, B) glatte Muskulatur x 40, C) Mamma CA x100, D) Fett x40 ..... 49

Abbildung 14 AK W3C4, mit der Durchflusszytometrie erhobene Daten; links von oben, Zelltyp: mesenchymale Stammzellen, Vorhautfibroblasten, LMS, RMS, LS; mittig Histogramme und rechts Dot Plots mit Angabe der Marker positiven Zellen in Prozent (1) ..... 51

Abbildung 15 Fotos in Spalten: links H.E.-Färbung, rechts IHC-Färbung mit AK W7C5F8 1) Reihe Leiomyosarkom, Patient 3, 1.1 x200 und 1.2 x100 Originalvergrößerung 2) Reihe Rhabdomyosarkom, Patient 8, 2.1 und 2.2 x100 Originalvergrößerung ..... 53

Abbildung 16 Multi tissue, IHC-Färbung mit AK W7C5F8, Originalvergrößerung: A) Haut x40, B) glatte Muskulatur x40, C) Mamma CA x100, D) Fett x40 ..... 55

Abbildung 17 AK W7C5F8, mit der Durchflusszytometrie erhobene Daten; links von oben, Zelltyp: mesenchymale Stammzellen, Vorhautfibroblasten, LMS, RMS, LS; mittig Histogramme und rechts Dot Plots mit Angabe der Marker positiven Zellen in Prozent (1) ..... 57

Abbildung 18 Fotos in Spalten: links H.E.-Färbung, rechts IHC-Färbung mit AK W5C5 1) Reihe Leiomyosarkom, Patient 2, 1.1 und 1.2 x200 Originalvergrößerung 2) Reihe Rhabdomyosarkom, Patient 9, 2.1 x100 und 2.2 x200 Originalvergrößerung 3) Reihe Liposarkom, Patient 11, 3.1 x10 und 3.2 x200 Originalvergrößerung ..... 59

Abbildung 19 Multi tissue, IHC-Färbung mit AK W5C5, Originalvergrößerung: A) Haut x40, B) glatte Muskulatur x40, C) Mamma CA x100, D) Fett x40 ..... 61

Abbildung 20 AK W5C5, mit der Durchflusszytometrie erhobene Daten; links von oben, Zelltyp: mesenchymale Stammzellen, Vorhautfibroblasten, LMS, RMS, LS; mittig Histogramme und rechts Dot Plots mit Angabe der Marker positiven Zellen in Prozent (1) ..... 63

Abbildung 21 Fotos in Spalten: links H.E.-Färbung, rechts IHC-Färbung mit AK W3D5A9 1) Reihe Leiomyosarkom, Patient 3, 1.1 und 1.2 x200 Originalvergrößerung 2) Reihe Rhabdomyosarkom, Patient 6, 2.1 x100 und 2.2 x200 Originalvergrößerung 3) Reihe Liposarkom, Patient 14, 3.1 x100 und 3.2 x100 Originalvergrößerung ..... 65

Abbildung 22 Multi tissue, IHC-Färbung mit W3D5A9, Originalvergrößerung A) Haut x40, B) glatte Muskulatur x40, C) Mamma CA x40, D) Fett x40 ..... 67

Abbildung 23 AK W3D5A9, mit der Durchflusszytometrie erhobene Daten; links von oben, Zelltyp: mesenchymale Stammzellen, Vorhautfibroblasten, LMS, RMS, LS; mittig Histogramme und rechts Dot Plots mit Angabe der Marker positiven Zellen in Prozent (1) .....69

Abbildung 24 Fotos in Spalten: links H.E.-Färbung, rechts IHC-Färbung mit 39D5-CD56 1) Reihe Leiomyosarkom, Patient 4, 1.1 und 1.2 x200 Originalvergrößerung 2) Reihe Rhabdomyosarkom, Patient 10, 2.1 x100 und 2.2 x200 Originalvergrößerung 3) Reihe Liposarkom, Patient 11, 3.1 x 10 und 3.2 x200 Originalvergrößerung .....71

Abbildung 25 Multi tissue, IHC-Färbung mit 39D5-CD56, Originalvergrößerung: A) Haut x40, B) glatte Muskulatur x40, C) Mamma CA x100, D) Fett, x40 .....73

Abbildung 26 AK 39D5-CD56, mit der Durchflusszytometrie erhobene Daten; links von oben, Zelltyp: mesenchymale Stammzellen, Vorhautfibroblasten, LMS, RMS, LS; mittig Histogramme und rechts Dot Plots mit Angabe der Marker positiven Zellen in Prozent (1) .....75

Tabelle 1 Charakteristik der Patienten für IHC und Durchfluss-zytometrie .....6

Tabelle 2 Übersicht der monoklonalen Antikörper für IHC und Durchflusszytometrie .....7

Tabelle 3 Sekundärantikörper .....9

Tabelle 4 Verwendete Chemikalien und Reagenzien für IHC .....9

Tabelle 5 Verwendete Lösungen und Verdünnungen bei der IHC .....10

Tabelle 6 Verwendete Apparate, Geräte und Software bei der IHC und Durchflusszytometrie .....11

Tabelle 7 Verwendete Bedarfsartikel bei der IHC .....12

Tabelle 8 Verwendetes Material aus der Pathologie .....12

Tabelle 9 Übersicht und Abkürzungen der monoklonalen Antikörper .....20

## 7 Literaturverzeichnis

1. Wirths S, Malenke E, Kluba T, Rieger S, Müller M R, Schleicher S, H.v. Wehyern C, Nagel F, Fend F, Vogel W, Mayer F, Kanz L, Kopp HG, Shared Cell Surface Marker Expression in Mesenchymal Stem Cells and Adult Sarcomas. STEM CELLS TRANSLATIONAL MEDICINE. 2013;2:53-60.
2. Kopp HG, Patel S, Brucher B et al. Potential combination chemotherapy approaches for advanced adult-type soft-tissue sarcoma. AM. J. CLIN. DERMATOL. 2008;9(4):207-217.
3. Jemal A, Siegel R, Ward E et al. Cancer statistics, 2009. CA CANCER J. CLIN. 2009;59(4):225-249.
4. Fletcher CDM, Unni KK, Mertens F. Pathology and Genetics of Tumours of Soft Tissue and Bone. Lyon: IARC Press, 2002.
5. Katenkamp D, Kosmehl H. Heterogeneity in malignant soft tissue tumors. CURR. TOP. PATHOL. 1995;89:123-151.
6. Katenkamp D. Cellular heterogeneity. Explanation for changing of tumor phenotype and biologic behavior in soft tissue sarcomas. PATHOL. RES. PRACT. 1988;183(6):698-705.
7. McArthur GA, Demetri GD, Van Oosterom A et al. Molecular and clinical analysis of locally advanced dermatofibrosarcoma protuberans treated with imatinib: Imatinib Target Exploration Consortium Study B2225. J. CLIN. ONCOL. 2005;23(4):866-873.
8. Verweij J, Casali PG, Zalcberg J et al. Progression-free survival in gastrointestinal stromal tumours with high-dose imatinib: randomised trial. LANCET 2004;364(9440):1127-1134.



9. Nielsen TO, West RB. Translating gene expression into clinical care: sarcomas as a paradigm. J. CLIN. ONCOL. 2010;28(10):1796-1805.
10. Jin L, Hope KJ, Zhai Q et al. Targeting of CD44 eradicates human acute myeloid leukemic stem cells. NAT. MED. 2006;12(10):1167-1174.
11. Al Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A et al. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. PROC. NATL. ACAD. SCI. U. S. A 2003;100(7):3983-3988.
12. Kim CF, Jackson EL, Woolfenden AE et al. Identification of bronchioalveolar stem cells in normal lung and lung cancer. CELL 2005;121(6):823-835.
13. Singh SK, Hawkins C, Clarke ID et al. Identification of human brain tumour initiating cells. NATURE 2004;432(7015):396-401.
14. Charytonowicz E, Cordon-Cardo C, Matushansky I et al. Alveolar rhabdomyosarcoma: is the cell of origin a mesenchymal stem cell? CANCER LETT. 2009;279(2):126-136.
15. Li N, Yang R, Zhang W et al. Genetically transforming human mesenchymal stem cells to sarcomas: changes in cellular phenotype and multilineage differentiation potential. CANCER 2009;115(20):4795-4806.
16. Serakinci N, Guldberg P, Burns JS et al. Adult human mesenchymal stem cell as a target for neoplastic transformation. ONCOGENE 2004;23(29):5095-5098.
17. Tolar J, Nauta AJ, Osborn MJ et al. Sarcoma derived from cultured mesenchymal stem cells. STEM CELLS 2007;25(2):371-379.
18. Rodriguez R, Rubio R, Gutierrez-Aranda I et al. Fus-Chop Fusion Protein Expression Coupled to P53 Deficiency Induces Liposarcoma in Mouse but not Human Adipose-Derived Mesenchymal Stem/Stromal Cells. STEM CELLS 2011;29(2):179-92.

19. Rubio R, Garcia-Castro J, Gutierrez-Aranda I et al. Deficiency in p53 but not retinoblastoma induces the transformation of mesenchymal stem cells in vitro and initiates leiomyosarcoma in vivo. *CANCER RES.* 2010;70(10):4185-4194.
20. Reya T, Morrison SJ, Clarke MF et al. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *NATURE* 2001;414(6859):105-111.
21. Buhring HJ, Battula VL, Tremel S et al. Novel Markers for the Prospective Isolation of Human MSC. *ANN. N. Y. ACAD. SCI.* 2007;1106:262-271.
22. Borden EC, Baker LH, Bell RS et al. Soft tissue sarcomas of adults: state of the translational science. *CLIN. CANCER RES.* 2003;9(6):1941-1956.
23. Battula VL, Tremel S, Bareiss PM et al. Isolation of functionally distinct mesenchymal stem cell subsets using antibodies against CD56, CD271, and mesenchymal stem cell antigen-1. *HAEMATOLOGICA* 2009;94(2):173-184.
24. Clarke MF, Dick JE, Dirks PB et al. Cancer stem cells--perspectives on current status and future directions: AACR Workshop on cancer stem cells. *CANCER RES.* 2006;66(19):9339-9344.
25. Vogel W, Grunebach F, Messam CA et al. Heterogeneity among human bone marrow-derived mesenchymal stem cells and neural progenitor cells. *HAEMATOLOGICA* 2003;88(2):126-133.
26. Haniffa MA, Collin MP, Buckley CD et al. Mesenchymal stem cells: the fibroblasts' new clothes? *HAEMATOLOGICA* 2009;94(2):258-263.
27. Quirici N, Soligo D, Bossolasco P et al. Isolation of bone marrow mesenchymal stem cells by anti-nerve growth factor receptor antibodies. *EXP. HEMATOL.* 2002;30(7):783-791.

28. Yamamoto N, Akamatsu H, Hasegawa S et al. Isolation of multipotent stem cells from mouse adipose tissue. *J. DERMATOL. SCI.* 2007;48(1):43-52.
29. Boiko AD, Razorenova OV, van de RM et al. Human melanoma-initiating cells express neural crest nerve growth factor receptor CD271. *NATURE* 2010;466(7302):133-137.
30. Dechant G, Barde YA. The neurotrophin receptor p75(NTR): novel functions and implications for diseases of the nervous system. *NAT. NEUROSCI.* 2002;5(11):1131-1136.
31. Fujii H, Honoki K, Tsujiuchi T et al. Sphere-forming stem-like cell populations with drug resistance in human sarcoma cell lines. *INT. J. ONCOL.* 2009;34(5):1381-1386.
32. Bühring HJ, Kuçi S, Conze T et al. CDCP1 identifies a broad spectrum of normal and malignant stem/progenitor cell subsets of hematopoietic and nonhematopoietic origin. *STEM CELLS* 2004;22:334-343
33. Iwata M, Torok-Storb B, Wayner EA et al. CDCP1 identifies a CD146 negative subset of marrow fibroblasts involved with cytokine production. *PLoS One.* 2014 Oct 2;9(10)
34. Sobiesiak M, Sivasubramaniyan K, Hermann C et al. The mesenchymal stem cell antigen MSCA-1 is identical to tissue non-specific alkaline phosphatase. *STEM CELLS DEV.* 2010;19(5):669-677.
35. Battula VL, Bareiss PM, Treml S et al. Human placenta and bone marrow derived MSC cultured in serum-free, b-FGF-containing medium express cell surface frizzled-9 and SSEA-4 and give rise to multilineage differentiation. *DIFFERENTIATION.* 2007 Apr;75(4):279-91
36. Giesert C, Marxer A, Sutherland DR et al. Antibody W7C5 defines a CD109 epitope expressed on CD34+ and CD34- hematopoietic and

mesenchymal stem cell subsets. ANN N Y ACAD SCI. 2003 May;996:227-30.

37. Sivasubramaniyan K, Harichandan A, Schumann S et al. Prospective isolation of mesenchymal stem cells from human bone marrow using novel antibodies directed against Sushi domain containing 2. STEM CELLS DEV. 2013;22(13):1944-54.
38. Buhring HJ, Trembl S, Cerabona F et al. Phenotypic characterization of distinct human bone marrow-derived MSC subsets. ANN. N. Y. ACAD. SCI. 2009;1176:124-134.
39. Jones M, Mason D. Leukocyte Typing VI: CD10 workshop panel report. In: Kishimoto T, Kikutani H, von dem Borne A, eds. New York, NY: Garland Publishing, Inc., 1998:131-132.
40. Battula VL, Bareiss PM, Trembl S et al. Human placenta and bone marrow derived MSC cultured in serum-free, b-FGF-containing medium express cell surface frizzled-9 and SSEA-4 and give rise to multilineage differentiation. DIFFERENTIATION 2007;75(4):279-291.
41. Giesert C, Marxer A, Sutherland DR et al. Antibody W7C5 defines a CD109 epitope expressed on CD34+ and CD34- hematopoietic and mesenchymal stem cell subsets. ANN. N. Y. ACAD. SCI. 2003;996:227-230.
42. Doyonnas R, Yi-Hsin CJ, Butler LH et al. CD164 monoclonal antibodies that block hemopoietic progenitor cell adhesion and proliferation interact with the first mucin domain of the CD164 receptor. J. IMMUNOL. 2000;165(2):840-851.
43. Hennersdorf F, Florian S, Jakob A et al. Identification of CD13, CD107a, and CD164 as novel basophil-activation markers and dissection of two response patterns in time kinetics of IgE-dependent upregulation. CELL RES. 2005;15(5):325-335.

44. Seiffert M, Cant C, Chen Z et al. Human signal-regulatory protein is expressed on normal, but not on subsets of leukemic myeloid cells and mediates cellular adhesion involving its counterreceptor CD47. BLOOD 1999;94(11):3633-3643.
  
45. Buhring HJ, Muller T, Herbst R et al. The adhesion molecule E-cadherin and a surface antigen recognized by the antibody 9C4 are selectively expressed on erythroid cells of defined maturational stages. LEUKEMIA 1996;10(1):106-116.
  
46. Ritz J, Trinchieri G, Lanier LL. NK-cell antigens, section report. New York, NY: Oxford University Press, 1995:1367-1372.
  
47. Buhring HJ, Ullrich A, Schaudt K et al. The product of the proto-oncogene c-kit (P145c-kit) is a human bone marrow surface antigen of hemopoietic precursor cells which is expressed on a subset of acute non-lymphoblastic leukemic cells. LEUKEMIA 1991;5(10):854-860.

## 8 Anhang

### 8.1 Erklärung zum Eigenanteil

Alle angeführten Arbeitsgruppen gehörten zum Beginn der Studie der Medizinischen Fakultät der Universität Tübingen an. Die Autorin gehört der Arbeitsgruppe Kopp und Wirths an. Die Arbeitshypothese wurde gemeinschaftlich in der Arbeitsgruppe Kopp und Wirths konzipiert, sowie auch die praktischen Verfahren der Methoden für die Durchflusszytometrie und Immunhistochemie. Ein Teil der Antikörper wurden aus der Arbeitsgruppe Bühring übernommen, siehe Material 2.1.7..

Alle verwendeten und aufgeführten Gewebe und Zellen stammen von Patienten des Universitätsklinikums Tübingen und dürfen aufgrund deren Einverständniserklärung für Forschungszwecke verwendet werden.

Die wissenschaftliche Recherche wurden von allen Beteiligten der Arbeitsgruppe Kopp und Wirths (Prof. Dr. med. H.G. Kopp, Dr. med. S. Wirths, Fr. E. Malenke und Fr. S. Rieger) durchgeführt und zur Verfügung gestellt. Die Arbeitsschritte der praktischen Färbeverfahren und Laborstandards stammen aus der Arbeitsgruppe Kopp und Wirths und wurden von Frau Elke Malenke weiterentwickelt und von der Autorin übernommen.

Im Dezember 2012 wurde die Gemeinschaftsarbeit in einer Publikation „Shared Cell Surface Marker Expression in Mesenchymal Stem Cells and Adult Sarcomas“ (1) veröffentlicht. Co-Autoren sind S. Wirths, E. Malenke, T. Kluba, S. Rieger, M. R. Müller, S. Schleicher, C. H.v. Weyhern, F. Nagel, F. Fend, W. Vogel, F. Mayer, L. Kanz, H.J. Bühring, H.G. Kopp.

In diese Publikation floss die wissenschaftliche Aufarbeitung der Arbeitsgruppe Kopp und Wirths. Die von der Autorin mit entwickelte Arbeitshypothese findet sich in der Publikation, sowie der Einleitung dieser Arbeit mit Ergänzungen wieder. Ebenso wurde auch der Vergleich der wissenschaftlichen Recherche in der Diskussion und Zusammenfassung aus der gemeinsamen Publikation integriert und erweitert durch die eigene Studie der Immunhistochemie-



Färbungen von der Autorin, sowie das Literaturverzeichnis übernommen und ergänzt.

Die Durchführung und Erstellung der FACS-Daten erfolgte durch die Arbeitsgruppe Kopp und Wirths, vor allem durch die Chemielaborantin Frau Elke Malenke. Der Multi tissue-Block wurde von der Pathologie des Universitätsklinikums Tübingen zur Verfügung gestellt und von der MTA Frau Marit Osigus aufgearbeitet. Zur bessern Vergleichbarkeit wurden alle H.E. Schnitte von Frau Marit Osigus in der Pathologie automatisch gefärbt. Die Herstellung der Weichteilsarkom-Kryoschnitte, sowie die Immunhistochemie-Färbung der Weichteilsarkome und des Multi tissue erfolgte durch die Autorin. Die Autorin führte ebenso selbständig die primäre Auswertung der Immunhistochemie-Färbungen durch. Die Validierung und mikroskopische Überprüfung der Ergebnisse fand durch das onkologische Team Prof. Dr. med. Hans-Georg Kopp und Dr. med. Stefan Wirths statt, sowie durch die Pathologen Dr. med. Claus Hann von Weyhern und Dr. med. Florian Nagel.

Die Dissertation wurde aus der gemeinsamen Arbeitsgruppe beratend betreut und mit korrigiert von Prof. Dr. med. Hans-Georg Kopp und Chemielaborantin Frau Elke Malenke. Frau Dr. rer. nat. Lisa Steinhauser führte ebenso Verbesserungsvorschläge und Formatierungshilfen ein. Frau Dr. rer. nat. Melanie Märklin unterstützte bei der Formatierung.

Alle Abbildungen der FACS-Daten wurden erhoben von Frau Elke Malenke und teils in der erwähnten Publikation (1) verwendet. Abb. 1, 5, 8, 11, 14, 17, 20, 23 und 26 stammen aus der gemeinsamen Kooperation. Alle weiteren aufgeführten Abbildungen mit den darin enthaltenen Fotografien und Tabellen in dieser Arbeit wurden von der Autorin erstellt.

## 8.2 Versicherung an Eides statt

Ich erkläre hiermit, dass ich die zur Promotion eingereichte Arbeit mit dem Titel: „*Expression mesenchymaler Stammzell-Marker auf Sarkomen*“ selbständig verfasst, nur die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und wörtlich oder inhaltlich übernommene Stellen als solche gekennzeichnet habe. Ich erkläre, dass die Richtlinien zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis der Universität Tübingen (Beschluss des Senats vom 25.5.2000) beachtet wurden. Ich versichere an Eides statt, dass diese Angaben wahr sind und dass ich nichts verschwiegen habe. Mir ist bekannt, dass die falsche Abgabe einer Versicherung an Eides statt mit Freiheitsstrafe bis zu drei Jahren oder mit Geldstrafe bestraft wird.

Datum, Ort

Unterschrift

### 8.3 Danksagung

Herr Prof. Dr. med. Hans-Georg Kopp begleitete mich die gesamte Zeit betreuend durch die Promotionsarbeit und übernahm das erste Gutachten. Meinen außerordentlichen Dank widme ich ihm für seine sehr gute Unterstützung bei allen Herausforderungen und für sein Vertrauen.

Für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. univ. Bence Sipos bedanken.

Mein Dank geht auch an Herrn Prof. Dr. med. Frank Mayer für die Förderung meiner Dissertation.

Unserer Chemielaborantin Frau Elke Malenke verdanke ich die hervorragende Einführung in die Immunhistochemie und Durchflusszytometrie. Mit ihrer freundlichen und motivierenden Wesensart, sowie ihrem kompetenten Wissen war sie eine große Bereicherung, vom Herzen gilt ihr mein Dank.

Dem gesamten Laborteam der AG Kopp und Wirths danke ich für die gemeinsame Zeit, vor allem Dr. med. Stefan Wirths der sein Wissen immer konstruktiv zur Verfügung stellte. Frau Dr. Sabine Schleicher aus der Kinderheilkunde danke ich für den Austausch über ihre Erfahrung mit Weichteiltumoren. Herzlichen Dank an Frau Dr. rer. nat. Melanie Märklin für die spontane Unterstützung bei der Formatierung.

Die Realisierung meiner Arbeit war möglich durch die großzügige Freigabe des primären Tumormaterials aus der Pathologie, daher gilt dem Institut und Prof. Dr. med. Fend ein großer Dank meinerseits.

Dem Ärzteteam aus der Pathologie, vor allem Dr. med. Claus von Wehyern und Dr. Florian Nagl danke ich für die praktische Unterstützung bei der Validierung der Bewertungen IHCs. Frau Marit Osigus danke ich für die Herstellung des Multi Tissue-Blocks, sowie der zweiten H.E.-Färbung mittels Automaten. Ganz

herzlich möchte ich auf diesem Weg auch den Menschen danken, die ihr Gewebe zur Forschung freigegeben haben.

Ein großer Dank von Herzen geht an meine Freundin Dr. rer. nat. Lisa Steinhauser, die mich mit einer unglaublichen Ausdauer immer wieder antrieb und Verbesserungen angeführt hat für die Fertigstellung meiner Dissertation.

Einen ganz herzlichen Dank an meinen guten Freund Birger Loew für Anmerkungen und Verbesserungsvorschläge.

Ein liebevoller Dank gilt meiner Familie, die mir meine gesamte Studienzeit ermöglicht hat und zu jeder Zeit hinter mir stand. Ebenso möchte ich allen Menschen, insbesondere meinen Freunden und Mentoren danken, die mich auf meinem Weg zur Vollendung meiner Promotion begleitet zu haben.